

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa**  
**Departamento de Química e Bioquímica**



Avaliação do perfil químico do nudibrânquio  
*Hypselodoris fontandraui* e de consórcios bacterianos  
provenientes de esponjas marinhas

Tânia Sofia dos Santos Feliciano

Mestrado em Química

2009

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa**  
**Departamento de Química e Bioquímica**



Avaliação do perfil químico do nudibrânquio  
*Hypselodoris fontandraui* e de consórcios bacterianos  
provenientes de esponjas marinhas

Tânia Sofia dos Santos Feliciano  
Mestrado em Química

Orientadoras  
Susana Maria Pina dos Santos (DQB/FCUL)  
Helena Gaspar (DTIQ/INETI)

2009



## **Agradecimentos**

Às professoras Susana Santos e Helena Gaspar. Pela vossa dedicação, compreensão, transmissão de conhecimentos e ajuda durante todo o projecto.

Às minhas colegas do Departamento de Educação da FCUL, por me ajudarem a colmatar a minha ausência às segundas-feiras e não só.

À minha família e amigos, pelo apoio que me deram durante algumas fases mais difíceis.

À minha alma gémea, por existir... e pelo espaço na secretária.

Mas principalmente à minha mãe que, mesmo estando longe, nunca deixou de estar presente.

## Resumo

Esta tese foi realizada na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Tecnologias e Indústrias Químicas do Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação (INETI).

Este trabalho debruçou-se sobre o estudo da composição química de dois organismos marinhos distintos: o nudibrânquio *Hypselodoris fontandraui* e da estirpe bacteriana (#P1) isolada do interior da esponja *Phorbas* sp.

Estudou-se pela primeira vez o perfil dos metabolitos secundários existentes nos extractos de *n*-hexano (externo e interno) dos moluscos marinhos da espécie *Hypselodoris fontandraui*, recolhidos nas Berlengas (Portugal). Através de técnicas cromatográficas (coluna aberta e HPLC) ambos os extractos foram fraccionados, obtendo-se 3,6mg/animal do composto maioritário existente em ambos os extractos, que corresponde a 37% de rendimento total da extracção. O composto maioritário foi caracterizado por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135 e bi-dimensional e foi identificado como sendo o furanosesquiterpeno tavacpalascensina, pela primeira vez isolado desta espécie de nudibrânquio proveniente das águas costeiras portuguesas.

A segunda parte deste trabalho teve por base um estudo previamente efectuado sobre consórcios marinhos (Faneca, 2007) em que uma estirpe (P#1) foi isolada do interior da esponja *Phorbas* sp. recolhida em Setúbal (Portugal). Da fermentação à escala semi-piloto obtiveram-se as soluções de biomassa e de sobrenadante, de onde resultaram os extractos a estudar. Através de extracções líquido-líquido e de técnicas cromatográficas sucessivas foram efectuados os passos de fraccionamento. Utilizando a espectroscopia RMN tentou-se obter esclarecimento sobre a estrutura química dos compostos isolados. Infelizmente, não foram obtidos resultados conclusivos sobre a caracterização destes compostos. Contudo, pode afirmar-se que as técnicas de extracção e fraccionamento dos extractos tenham sido optimizadas fazendo com que numa segunda abordagem deste trabalho se consiga isolar com sucesso os metabolitos secundários produzidos pela bactéria estudada.

## Palavras-chave

tavacpalascensina — furanosesquiterpenos - *Hypselodoris fontandraui* — nudibrânquios — molusco marinho - consórcios marinhos — microrganismo marinho — *Phorbas* sp. - produtos naturais de origem marinha.

## Abstract

In this work we have evaluated the chemical composition of two distinct marine organisms: the nudibranch *Hypselodoris fontandraui* and a bacterial string isolated from the inside of a *Phorbas* sp. sponge.

We studied, for the first time, the existent secondary metabolite profile from the inner and outer extracts of *Hypselodoris fontandraui* collected from Berlengas, Portugal. Through chromatographic techniques (open column and HPLC), both extracts were fractionated and the major component was isolated, yielding 3,6mg/animal and 37% of the total extraction. This compound was analyzed by RMN (H, <sup>13</sup>C, DEPT 135 and correlation) and it was identified as being the furanosesquiterpen tavaçpallascensin, for the first time isolated from this species of nudibranch from the portuguese coastal waters.

The second half of this thesis was based on a previous study about bacterial consortia (Faneca, 2007) in which a string of the bacteria (P#1) was isolated from the inside of the *Phorbas* sp., collected from Setúbal, Portugal. From semi-pilot scale fermentation, solutions of the biomass and the fermenting media were obtained and extracted with the use of different solvents and then fractionated through chromatographic techniques.

An attempt to identify those isolated compounds was made using NMR spectroscopy. Unfortunately, those results weren't conclusive and no structural identification was possible. Although, it's true to state that all the techniques used in this study were optimized, enabling the successful isolation of the secondary metabolite of the bacteria in the following approaches of this subject.

## Keywords

tavaçpallascensin – furanosesquiterpen - *Hypselodoris fontandraui* – nudibranch — marine molluscs – marine consortia – marine bacteria – *Phorbas* sp. –marine natural products.

## Símbolos, acrónimos e abreviaturas

AcOEt	acetato de etilo
c.c.f.	cromatografia em camada fina
d	dubleto
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
e.e.	éter etílico
E <sup>+</sup>	Ehrlich positivo
extracto B/EE	extracto de éter etílico obtido a partir da biomassa
extracto B/D	extracto de diclorometano obtido a partir da biomassa
extracto S/EE	extracto de éter etílico obtido a partir do sobrenadante
hex	<i>n</i> -hexano
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
MeOH	metanol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
m	múltiplo
nm	nanómetros
ppm	partes por milhão
qC	carbono quaternário
R <sub>f</sub>	<i>Retardation factor</i> , factor de retardamento
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	rotações por minuto
s	singleto
t <sub>r</sub>	tempo de retenção
λ	comprimento de onda



## Índice geral

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	ii
Palavras-chave .....	iii
Abstract.....	iv
Keywords.....	iv
Símbolos, acrónimos e abreviaturas .....	v
Índice geral .....	vi
Índice de figuras .....	viii
Índice de tabelas .....	x
<b>1. Introdução .....</b>	<b>2</b>
1.1. O nudibrânquio <i>Hypselodoris fontandraui</i> .....	8
1.2. As esponjas marinhas e os seus consórcios bacterianos.....	14
<b>2. Resultados e discussão.....</b>	<b>18</b>
2.1. Avaliação dos extractos do <i>H. fontandraui</i> .....	20
2.1.1 Determinação da estrutura da tavacpalascensina.....	23
2.2. Estudo dos metabolitos secundários do consórcio bacteriano.....	33
2.2.1. Estudo do extracto de diclorometano obtido a partir da biomassa (B/D). 35	
2.2.2. Estudo do extracto de éter obtido a partir da biomassa B/EE .....	36
2.2.3. Estudo do extracto de éter obtido a partir do sobrenadante (S/EE).....	36
<b>3. Conclusão .....</b>	<b>42</b>
<b>4. Parte experimental .....</b>	<b>45</b>
4.1. Material e métodos .....	46
4.2. Estudo do metabolito secundário do <i>Hypselodoris fontandraui</i> .....	49
4.2.1. Recolha do material biológico .....	49
4.2.2. Obtenção dos extractos do <i>H. fontandraui</i> .....	49
4.2.3. Isolamento dos metabolitos secundários do <i>H. fontandraui</i> .....	49

4.3. Estudo químico do consórcio bacteriano obtido a partir da esponja <i>Phorbas</i> sp. ....	52
4.3.1. Recolha da esponja e crescimento do consórcio bacteriano.....	52
4.3.2. Obtenção dos extractos bacterianos.....	52
4.3.3. Isolamento dos metabolitos secundários do consórcio bacteriano .....	52
4.3.3.1. Extracto da biomassa .....	52
4.3.3.1.1. <i>Extracto de diclorometano</i> .....	53
4.3.3.1.2. <i>Extracto de éter</i> .....	54
4.3.3.2. Extracto do sobrenadante .....	55
<b>5. Bibliografia.....</b>	<b>60</b>
<b>6. Anexos.....</b>	<b>71</b>
6.1 Taxonomia .....	72
6.2. Espectros e cromatogramas .....	73
6.3 Composição dos reveladores .....	78

## Índice de figuras

Figura 1: Abundância relativa dos compostos marinhos provenientes dos diferentes filos (Hunt & Vincent, 2006).....	3
Figura 2: Ilustração da diversidade química de moléculas derivadas de esponjas.....	4
Figura 3: Quantidade de novos produtos naturais marinhos isolados desde 1965 até 2006 (Costa-Lotufo, 2009) .....	6
Figura 4: Estrutura química de três fármacos baseados em produtos naturais de origem marinha: (1) ziconitida; (2) ecteinascidina 743 e (3) citosina arabinose.....	7
Figura 5: Morfologia externa geral dos nudibrânquios .....	9
Figura 6: Metabolitos secundários isolado do género <i>Hypselodoris</i> .....	11
Figura 7: <i>Hypselodoris fontandraui</i> [1].....	12
Figura 8: A) Representação esquemática de uma esponja e o fluxo de água (Taylor, 2007). B) Imagem de um espécime pertencente a género <i>Phorbas</i> ( <i>P. topsenti</i> ) [9].....	14
Figura 9: Cromatograma comparativo do perfil dos extractos exterior e interior do <i>H. fontandraui</i> .....	20
Figura 10: C.c.f em fase normal do (I) extracto interno e (E) exterior revelados com luz UV e revelador Ehrlich.....	21
Figura 11: Cromatogramas 1 e 2 de todas as fracções do extracto externo e interno do <i>H. fontandraui</i> , respectivamente. ....	21
Figura 12: Cromatograma comparativo dos espectros do composto maioritário dos dois extractos do <i>H. fontandraui</i> .....	22
Figura 13: Cromatograma da amostra (Int+Ext) contendo o composto maioritário dos dois extractos do <i>H. fontandraui</i> .....	22
Figura 14: Espectro de $^1\text{H}$ RMN do composto isolado do extracto externo do <i>H. fontandraui</i> ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ) .....	23
Figura 15: Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN do composto isolado do extracto externo do <i>H. fontandraui</i> ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ) .....	25
Figura 16: Espectro de DEPT 135 do composto isolado do extracto externo do <i>H. fontandraui</i> ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ) .....	25
Figura 17: Espectro de HMQC do composto isolado do extracto externo do <i>H. fontandraui</i> ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ) .....	26

Figura 18: Espectro de HMBC do composto isolado do extracto externo do <i>H. fontandraui</i> (C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ) .....	28
Figura 19: Estrutura parcial do composto.....	29
Figura 20: Estrutura parcial do furanosesquiterpeno e a algumas correlações chave observados no espectro HMBC .....	30
Figura 21: Estrutura do furanosesquiterpeno evidenciando os desvios químicos e algumas correlações obtidas pelo espectro de HMBC. ....	30
Figura 22: Estrutura química do furanosesquiterpeno isolado do <i>H. fontandraui</i> .....	31
Figura 23. Estirpe #P1 apresentando forma de bastonete e respectiva coloração de Gram	33
Figura 24: C.c.f. dos extractos de éter da biomassa B/EE e do sobrenadante S/EE.....	34
Figura 25: C.c.f em sílica gel de fase normal do extracto da biomassa extraído com diclorometano B/D. Revelador: Ehrlich+H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + aquecimento .....	34
Figura 26: Esquema dos passos de purificação dos compostos provenientes do consórcio bacteriano .....	35
Figura 27: C.c.f. sílica gel de fase reversa (1) C[2-6] e (2) C[7-38]. Revelador: Ehrlich+aquecimento.....	37
Figura 28: C.c.f. sílica gel de fase reversa das fracções D26, D25, D16 e D8. Revelador: Ehrlich+ aquecimento.....	38
Figura 29: Espectro de RMN <sup>1</sup> H da fracção A44 proveniente da cc A.....	73
Figura 30: Cromatograma do HPLC da fracção B[15-17] proveniente da cc B .....	74
Figura 31: Cromatograma do HPLC da fracção D26 proveniente da cc D.....	75
Figura 32: Cromatograma dos compostos DP <sub>1</sub> a DP <sub>8</sub> .....	75
Figura 33: Cromatogramas da amostra DP <sub>7</sub> nas várias soluções após a cromatografia HPLC .....	76
Figura 34: Cromatograma comparativo de amostras DP <sub>7</sub> em que se utilizou éter não destilado (espectro superior) e destilado (espectro inferior). ....	77

## Índice de tabelas

Tabela 1: Resumo dos metabolitos secundários isolados do género <i>Hypselodoris</i> .....	9
Tabela 2: Dados de RMN da tavacpalascensina.....	31
Tabela 3: Massa dos extractos obtidos após extracção com éter etílico e diclorometano.	33
Tabela 4: Condições de eluição da coluna cromatográfica para separação dos compostos dos extractos interior e exterior do <i>H. fontandraui</i> . ....	50
Tabela 5: Massas e rendimentos obtidos das fracções provenientes da cromatografia do extracto exterior com <i>n</i> -hexano .....	50
Tabela 6: Massas e rendimentos obtidos das fracções provenientes da cromatografia do extracto interior com <i>n</i> -hexano .....	50
Tabela 7: Condições de operação para purificação das fracções isoladas dos extractos do <i>H. fontandraui</i> .....	51
Tabela 8: Condições de trabalho da cromatografia em coluna A sob pressão .....	53
Tabela 9: Resultados da cc A do extracto B/D.....	54
Tabela 10: Condições de eluição da cromatografia HPLC da amostra A44.....	54
Tabela 11: Condições de trabalho da cc B para análise do extracto B/EE.....	54
Tabela 12: Tabela resumo das fracções e correspondentes massas obtidas da cc B do extracto B/EE.....	55
Tabela 13: Condições de eluição da fracção B[15-17] em HPLC.....	55
Tabela 14: Condições de trabalho da cc C para análise do extracto S/EE .....	56
Tabela 15: Massas das fracções recolhidas e respectivos eluentes utilizados na cc C.....	56
Tabela 16: $R_f$ das manchas e massas dos compostos isolados por c.c.f. preparativa .....	57
Tabela 17: Condições de trabalho da cc D para análise do extracto S/EE .....	57
Tabela 18: Massas das fracções recolhidas e respectivos eluentes utilizados na cc D.....	58
Tabela 19: Condições de trabalho da cromatografia HPLC da amostra D26.....	59
Tabela 20: Tempos de retenção ( $t_R$ ) e massas dos compostos isolados por HPLC da fracção D26 .....	59



## 1. Introdução

---

A Natureza desde sempre tem sido alvo do interesse do Homem, sendo a ela que sempre recorreu para encontrar tratamento e prevenir doenças que afligem a humanidade. Muitas plantas sintetizam uma variedade de diferentes produtos naturais, que, na sua maioria, são moléculas únicas e que servem como protecção contra inimigos ou que são de importância vital para a sua alimentação ou reprodução. Estas moléculas têm sido desde sempre objecto de fascínio e utilidade, providenciando uma grande parte da motivação para o desenvolvimento da química orgânica. Da morfina à penicilina, passando pelos anti-cancerígenos, estima-se que 80% dos fármacos em uso são produtos naturais ou foram inspirados pela natureza (Costa-Lotufo, 2009).

Os produtos naturais (também designados por metabolitos secundários) são diferentes das macromoléculas mais prevalentes, como as proteínas e ácidos nucleicos, que constituem o mecanismo base para a vida do organismo. Na sua maioria, estes metabolitos secundários constituem uma fracção ínfima da biomassa total e nem sempre é claro o seu papel bioquímico. No entanto, é consensual que o elevado custo energético de produzir e manter compostos potencialmente tóxicos tem que ser compensado pelo benefício a nível da defesa do organismo produtor. Existem muitas teorias sobre o objectivo da produção destes metabolitos secundários. Aquela que adquiriu maior consenso junto da comunidade científica foi a que indicava que os produtos naturais evoluíram devido à pressão da selecção natural e que representam a resposta ecológica do organismo ao seu ambiente. Concretamente, os organismos marinhos encontram-se sobre constante competição por espaço, luz e nutrientes. Seria de esperar que tenham desenvolvido uma panóplia de mecanismos de defesa, físicos (e.g. superfícies de sílica protectora) e químicos, para garantir a sua sobrevivência (Ianora et al, 2006).

Cerca de 70% da superfície terrestre é coberta pelos oceanos e é o meio aquático o que apresenta a maior biodiversidade de espécies conhecidas (e por conhecer). Pode afirmar-se que os ecossistemas marinhos constituem uma vasta fonte de novos produtos químicos, sendo um óptimo ponto de partida para a descoberta de novos agentes quimio-terapêuticos. De facto, até 2006 contabilizaram-se mais de 16 000 novos compostos isolados de esponjas, tunicatos, corais, algas, bactérias marinhas, entre outros (Ianora *et al*, 2006) e um aumento de 24% desse número no ano de 2007 (Blunt *et al*, 2009). Os organismos dos quais foram isolados um maior número de compostos foram as esponjas, representantes do filo *Porifera*, seguindo-se do filo *Cnidaria* (anémonas, alforrecas) e *Urochordata* (tunicatos), como se pode observar na figura 1.



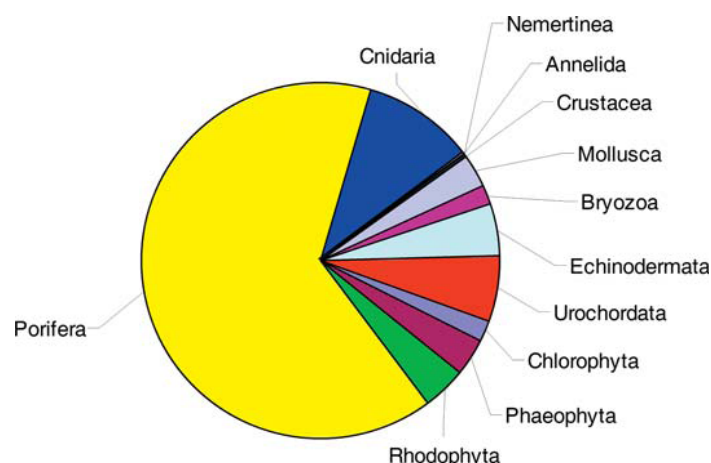


Figura 1: Abundância relativa dos compostos marinhos provenientes dos diferentes filos (Hunt & Vincent, 2006)

Os produtos obtidos dos organismos marinhos pertencem a um grande leque de classes químicas, como por exemplo, terpenos, péptidos, ácidos gordos, alcalóides, entre outros, assim como apresentam actividades diversas: anti-cancerígena, antibiótica, anti-viral, anti-inflamatória, anti-coagulante, “anti-fouling” etc. (Anand *et al*, 2006, Mayer *et al*, 2009; Sipkema, *et al*, 2005). A título exemplificativo, a figura 2 apresenta alguns dos muitos produtos naturais recolhidos de esponjas.

Independentemente dos organismos marinhos serem, indiscutivelmente, uma fonte prolífera de produtos bioactivos, algumas dificuldades fazem com que apenas uma pequena fracção dos produtos testados cheguem à fase de testes clínicos e um número ainda mais reduzido chegue mesmo a ser comercializado. O verdadeiro obstáculo para o desenvolvimento de novos compostos que estejam em fase de ensaios clínicos ou mesmo a serem pré-avaliados é o problema da quantidade necessária. Os metabolitos de interesse encontram-se em quantidades muito diminutas, cerca de  $10^{-6}\%$  do peso do macro-organismo (Proksch, 2002) pelo que a recolha do seu “habitat” natural iria conduzir a uma rápida extinção das espécies em causa. Por exemplo, a halicondrina B é um produto anti-neoplásico isolado da esponja australiana *Lissodendoryx* sp, que se encontra em ensaios laboratoriais. Desta esponja obteve-se o maior rendimento conhecido (300 mg/ton esponja) e são necessárias, só para os ensaios clínicos, cerca de 10 g da substância. Existindo apenas 280 ton desta espécie no seu “habitat” natural, é óbvio que este método de obtenção da substância activa não é sustentável (Vogel,

2008). Como tal, a aquacultura, a síntese química e a fermentação de microrganismos marinhos apresentam-se como soluções ao problema existente.

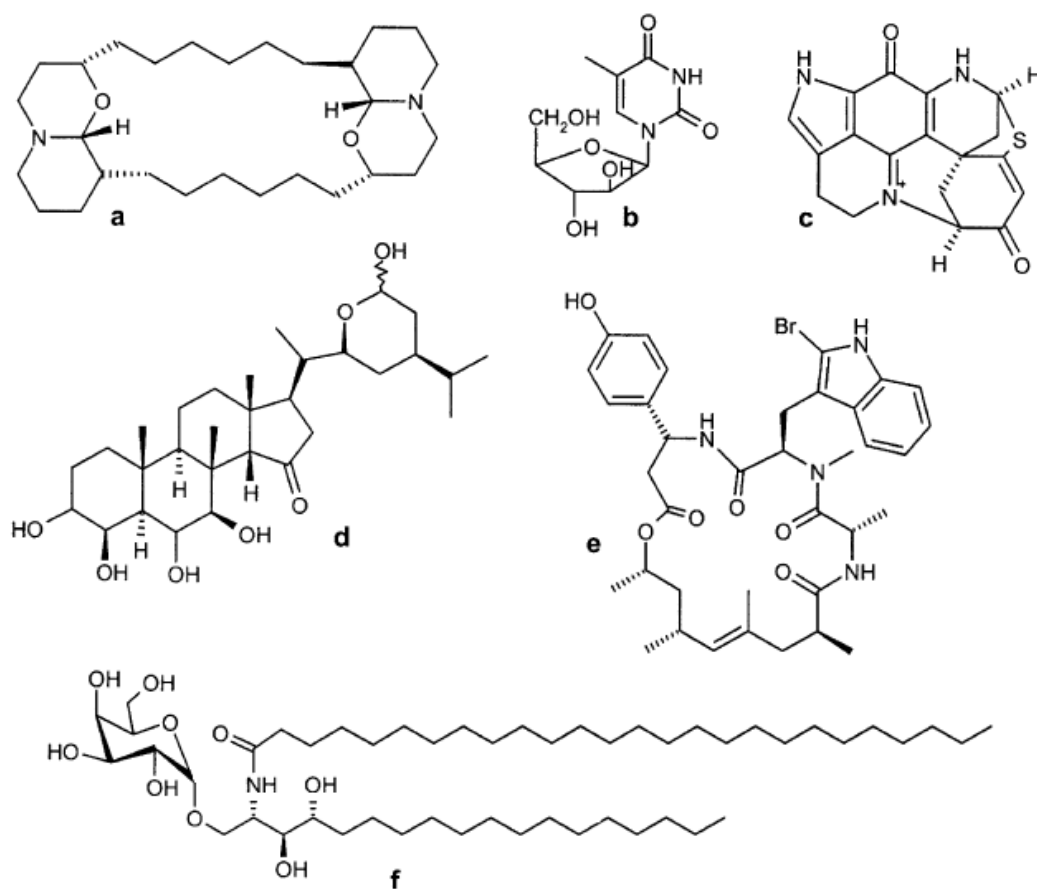


Figura 2: Ilustração da diversidade química de moléculas derivadas de esponjas: a) xestospongina C, um macrocíclico bis-oxaquinolizidina (*Xestospongia* sp.); b) spongotimidina, um nucleósido pouco habitual (*Cryptotethia crypta*); c) discorhabdina D, um alcalóide (*Latrunculia brevis*, *Prianos* sp.); d) contignasterol, um esteroide oxigenado (*Petrosia contignata*); e) jaspamida, uma lactona macrocíclica (*Hemiasrella minor*); f) agelasfina, uma galactosilceramida (*Agelas mauritanus*) (Sipkema, *et al*, 2005).

A aquacultura *in situ* ou crescimento *in vitro* dos organismos marinhos seria um modo de garantir uma quantidade de produto constante. No entanto, verifica-se que controlar todas as variáveis para manter as condições ótimas de crescimento é uma tarefa complexa e que difere de organismo para organismo. Este método poderá colmatar algumas das necessidades do produto mas encontra-se longe de ser a solução para o problema (Osinga *et al*, 1999; Hunt & Vincent, 2006).

A síntese química (total ou parcial) é outro dos processos alternativos para a produção em larga escala dos compostos bioactivos. Contudo, os produtos naturais tendem a apresentar estruturas químicas muito complexas, tornando a sua síntese difícil. No entanto, com a evolução da química e das técnicas combinatórias, os produtos naturais têm vindo a tornar-se uma plataforma para o desenvolvimento de novos fármacos. A química combinatória envolve ter um composto que serve como estrutura base e construir à sua volta uma biblioteca com as diversas novas estruturas obtidas, isolando e purificando apenas os compostos que apresentem potencial, com a esperança de se descobrir um produto análogo e/ou derivado mas mais activo (ou menos tóxico).

Hoje em dia, a fermentação é sem dúvida um dos métodos mais viáveis para produção de produtos naturais em larga escala (e.g. penicilina, ácido clavulânico). A compreensão de que alguns produtos naturais de origem marinha possam ser produzidos por microrganismos associados aumentou a possibilidade de se conseguir obter uma fonte sustentável e ilimitada de composto para os testes e subsequente produção do fármaco. No entanto, quando se trata da exploração biotecnológica dos microrganismos associados às esponjas, esta encontra-se limitada pela dificuldade em fazê-los crescer num fermentador. Apenas 5% da comunidade simbiótica consegue fazer-se crescer e isolar-se em laboratório, sendo a grande maioria (cerca de 95%) pertencente ao género *Vibrio* ou *Bacillus* (Anand *et al*, 2006; Vogel, 2008). No entanto, existem estudos em que foi possível crescer microrganismos marinhos até à data “incultiváveis”, simulando as condições naturais do seu “habitat” (Kaeberlein *et al*, 2002) ou combinando encapsulagem das células bacterianas com um fluxo pobre em nutrientes (Zengler *et al*, 2002).

Desde os anos 50, em que foram isolados os primeiros compostos provenientes de organismos marinhos (Bergman & Finney, 1949), que se verificou um crescimento progressivo do interesse pelos ecossistemas marinhos, descobrindo-se novas e excitantes moléculas com potente actividade biológica. A figura 3 representa a evolução do isolamento dos produtos naturais marinhos desde 1965 a 2006.

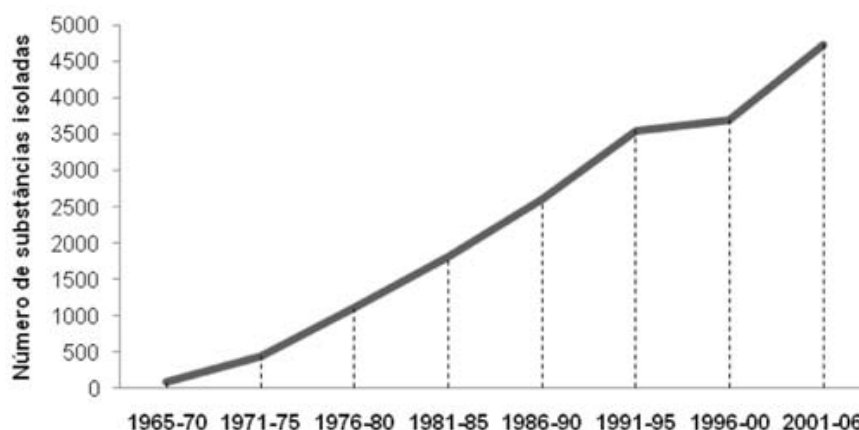


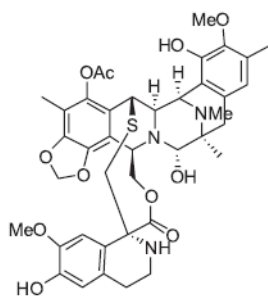
Figura 3: Quantidade de novos produtos naturais marinhos isolados desde 1965 até 2006 (Costa-Lotufo, 2009)

Observa-se no início dos anos 90 uma diminuição de interesse por parte da indústria farmacêutica que preferiu apostar na síntese química para a descoberta de novos fármacos. Por esta altura, ainda nenhum fármaco de origem marinha se encontrava comercializado. No entanto, a hipótese levantada por muitos cientistas de serem os microrganismos simbiotes os verdadeiros produtores dos metabolitos de interesse, juntamente com o desenvolvimento de novas técnicas de análise e o avanço da genética, veio reacender o interesse da indústria farmacêutica por esta área de investigação.

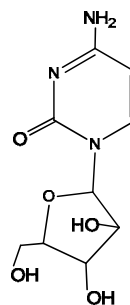
Neste momento já existem alguns fármacos de origem marinha a serem comercializados e muitos outros em ensaios clínicos. Alguns exemplos de sucesso de fármacos baseados em produtos naturais marinhos encontram-se representados na figura 4. A ziconitida (1) (Prialt®) comercializada em 2004, para o tratamento de dores crónicas é baseada num péptido isolado do veneno do caracol marinho, *Conus magnus*. A comercialização do anti-cancerígeno ecteinascidina 743 (2) (Yondelis®) iniciou-se em 2007 e trata-se de um péptido de 25 aminoácidos, obtido por hemi-síntese a partir de um composto semelhante ao extraído do tunicato *Ecteinascidia turbinata* (Hunt & Vincent, 2006). A citosina arabinose, Ara-C (3) (Citarabina®) foi baseada num composto isolado de uma esponja marinha (*Cryptotethia crypta*) no início dos anos 50 e foi o primeiro agente anti-cancerígeno de origem marinha a ser comercializado, em 1969. Ainda hoje é utilizada para o tratamento de linfomas e leucemia.



(1)



(2)



(3)

Figura 4: Estrutura química de três fármacos baseados em produtos naturais de origem marinha: (1) ziconitida; (2) ecteinascidina 743 e (3) citosina arabinose

Todo o conhecimento acumulado do estudo, principalmente do meio acadêmico, dos produtos naturais marinhos, resulta na afirmação do potencial terapêutico dessas moléculas. A indústria farmacêutica é o investidor principal das etapas de ensaios pré-clínicos e clínicos no processo de I&D dos fármacos, pelo que serão essas empresas a determinar quais os produtos com potencial para atingir o mercado. Entre a descoberta da molécula à prateleira da farmácia, o processo demora cerca de 15 anos e milhões de euros são investidos pelas indústrias farmacêuticas (no caso de produtos anticancerígenos, poderão ser envolvidos valores na ordem dos 600 milhões de euros).

### 1.1. O nudibrânquio *Hypselodoris fontandraui*

Os moluscos gastrópodes da sub-classe *Opisthobranchia* (capítulo 6.1 Taxonomia), também conhecidos por “lesmas do mar”, aparentam ser seres muito bem providos de metabolitos secundários, uma vez que têm muito poucos predadores naturais. Nestes gastrópodes, a redução da protecção física providenciada por uma concha é compensada por uma desenvolvida e complexa estratégia de defesa química. Estes espécimes ocupam muitos nichos ecológicos e podem ser herbívoros ou carnívoros, capazes de se alimentarem de esponjas, algas ou tunicatos (Ianora, 2006).

Verifica-se em alguns indivíduos da ordem *Nudibranchia*, completamente desprovidos de concha, que estes conseguem reter os metabolitos secundários provenientes da sua fonte de alimentação, principalmente das esponjas. Os metabolitos secundários são utilizados pelas esponjas para se protegerem dos predadores e o mesmo efeito é observado nos nudibrânquios (Prokesh, 1994; Hochlowski *et al*, 1982; Fontana *et al*, 1993; Karuso *et al*, 2002; Gavagnin *et al*, 2001). Verificou-se, no entanto, que alguns dos compostos isolados destes animais não existiam na esponja da qual se alimentavam, colocando-se a hipótese de o organismo modificar os metabolitos secundários ou até, tendo esse composto como substrato, sintetizar químicos *de novo* de modo a obter a sua alomona<sup>1</sup> defensiva mais eficaz ou um composto menos tóxico para o molusco (Avila *et al*, 1991; Cimino, 1993; Gavagnin *et al*, 2001). Estas alomonas protegem os animais atacando os seus predadores provocando mau estar ou mesmo a morte. Do estudo dos nudibrânqueos verificou-se, na sua maioria, que os compostos por eles concentrados eram compostos dissuasores, informando o seu predador que o animal não é palatável, isto é, tem um sabor desagradável.

De um modo geral, os nudibrânquios apresentam: brânquias ou plumas branquiais que são os órgãos respiratórios e encontram-se na zona exterior e posterior do animal, em redor do ânus; os rinóforos são órgãos sensoriais e localizam-se na zona anterior e o manto, que cobre todo o animal até ao pé (figura 5). É no manto que, em algumas espécies, se localizam glândulas denominadas Formações Dérmicas do Manto

---

<sup>1</sup> Em Ecologia, utiliza-se o termo “alomona” para designar qualquer substância química produzida e libertada por um indivíduo de uma espécie e que afecta o comportamento de um membro de outra espécie, beneficiando o produtor.

(FDM). São nestas glândulas que as alomonas defensivas se encontram concentradas pelo que se pensa que as FDM estejam envolvidas na função defensiva, apresentando propriedades ictiotóxicas e como dissuasor alimentar (Avila *et al*, 1991; Fontana *et al*, 1994; Garcia-Gómez, 1990). Estas propriedades dos metabolitos secundários provenientes destes animais suscitaram o interesse de equipas de cientistas que isolaram vários compostos e verificaram a sua actividade biológica, com a perspectiva de enriquecer o conhecimento sobre estes animais assim como descobrir novos compostos que poderão ser fonte de inspiração para novos fármacos.

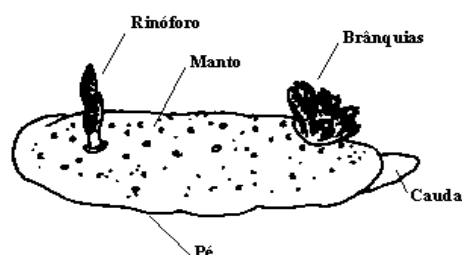


Figura 5: Morfologia externa geral dos nudibrânquios

Várias espécies do género *Hypselodoris*, de diferentes oceanos, foram estudadas e vários metabolitos secundários foram isolados, a maioria deles com funções defensivas comprovadas. Apresenta-se na tabela 1 a síntese da recolha bibliográfica dos compostos isolados de espécimes do género *Hypselodoris* e informações sobre a sua actividade biológica (quando disponíveis).

Tabela 1: Resumo dos metabolitos secundários isolados do género *Hypselodoris*

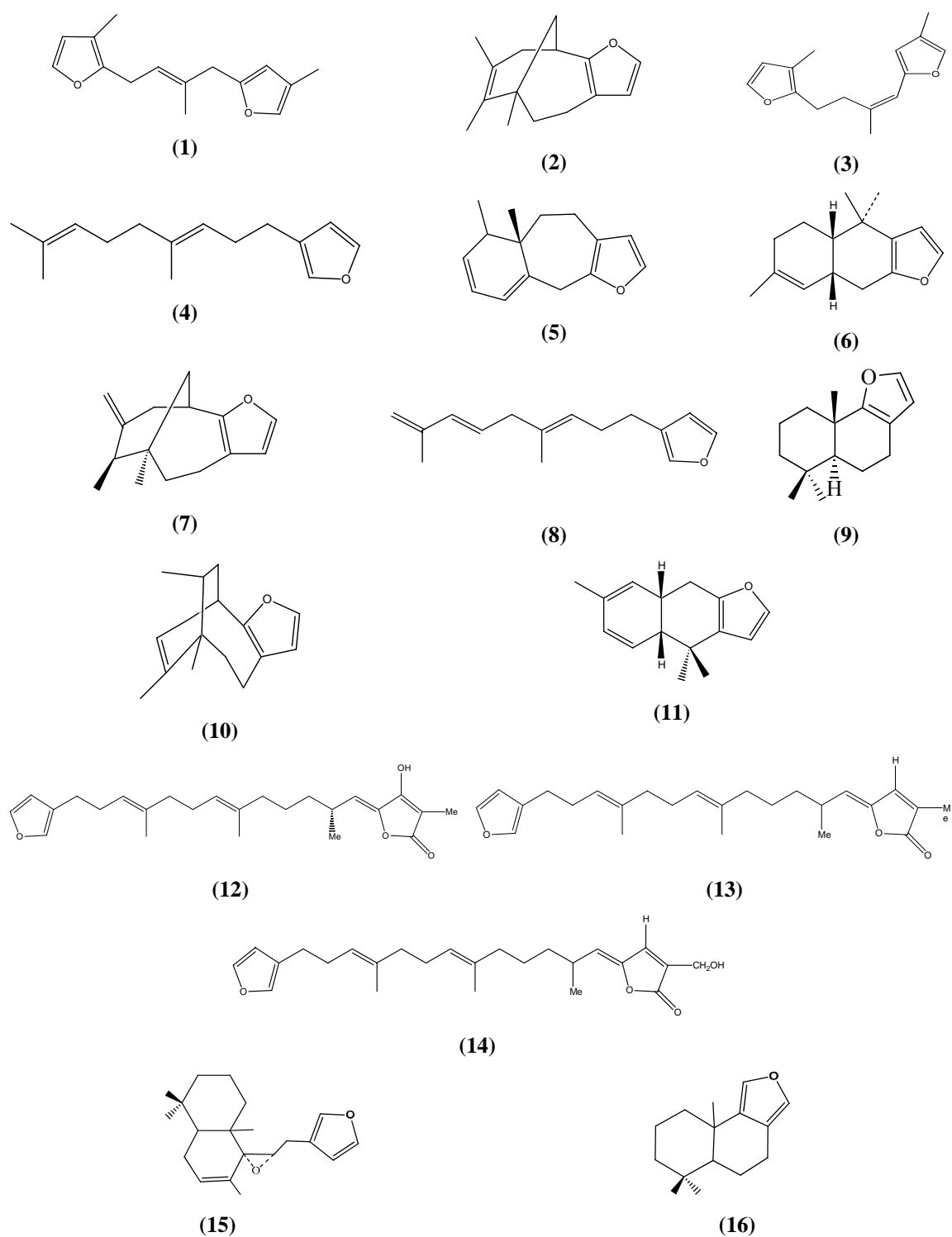
Metabolito secundário	Espécie	Área geográfica	Toxicidade	Referência
Longifolin (1)	<i>H. webbi</i>	Castellamere e Taranto (Itália); Blanes (Catalunha); Estreito de Gibraltar	Tóxico para <i>Gambusia affinis</i> (10ppm).	Avila, 1991 Cimino, 1982
	<i>H. cantabrica</i>	Atlântico norte (Cantábria)	Actividade anti-alimentar contra <i>Carassius auratus</i> (300 mg/cm <sup>2</sup> )	Garcia-Gomez, 1990 Fontana, 1993 Fontana, 1994
	<i>H. villafranca</i>	Atlântico norte (Astúria e Las Llanas); Taranto (Itália)		
	<i>H. tricolor</i>	Atlântico norte (Las Llanas)		
Nakafuran-9 (2)	<i>H. cantabrica</i>	Atlântico norte (Astúrias)	Actividade anti-alimentar contra <i>Carassius auratus</i>	Fontana, 1993 McPhail, 1998 Avila, 1991 Karuso, 2002 Hochlowski, 1982
	<i>H. villafranca</i>	Atlântico norte (Astúria e Las Llanas)		
	<i>H. infucata</i>	Baía Kaneohe (Hawaii)		
	<i>H. tricolor</i>	Atlântico norte (Las Llanas)		
	<i>H. carpensis</i>	África do sul		
	<i>H. webbi</i>	Taranto (Itália);		
	<i>H. godeffroyana</i>	Hawaii		
Tavacfuran (3)	<i>H. ghiselini</i>	Golfo da Califórnia	Actividade anti-alimentar contra <i>Carassius auratus</i> (300 mg/cm <sup>2</sup> )	Fontana, 1993
	<i>H. cantabrica</i>	Atlântico norte (Cantábria)		
	<i>H. villafranca</i>	Atlântico norte (Astúria e Las Llanas)		
	<i>H. tricolor</i>	Atlântico norte (Las Llanas)		

<i>Dendrolasin</i> (4)	<i>H. cantabrica</i>	Atlântico norte (Cantábria)	Atividade anti-alimentar contra <i>Carassius auratus</i> (300 mg/cm <sup>2</sup> )	Fontana, 1993 Hochlowski, 1982
	<i>H. villafranca</i>	Atlântico norte (Las Llanas)		
	<i>H. tricolor</i>	Atlântico norte (Las Llanas)		
	<i>H. ghiselini</i>	Golfo da Califórnia		
	<i>H. californiensis</i>	Golfo da Califórnia		
<i>Agassizin</i> (5)	<i>H. canababrica</i>	Atlântico norte (Cantábria)	-	Fontana, 1993 Hochlowski, 1982
	<i>H. villafranca</i>	Atlântico norte (Las Llanas)		
	<i>H. tricolor</i>	Atlântico norte (Las Llanas)		
	<i>H. agassiz</i>	México		
<i>ent-Furodysinin</i> (6)	<i>H. bayeri</i>	Cuba	Muito tóxico contra <i>Gambusia affinis</i> (10ppm) Atividade anti-alimentar contra <i>Carassius auratus</i> (300, 150, 30 mg/cm <sup>2</sup> )	Fontana, 1993 Fontana, 1994 Hochlowski, 1982
	<i>H. canababrica</i>	Atlântico norte (Cantábria)		
	<i>H. villafranca</i>	Atlântico norte (Las Llanas)		
	<i>H. tricolor</i>	Atlântico norte (Las Llanas)		
	<i>H. webbi</i>	Espanha		
	<i>H. californiensis</i>	São Diego, Califórnia		
<i>Isonakafuran-9</i> (7)	<i>H. porterae</i>	Point Loma, Califórnia	Atividade anti-alimentar contra <i>Carassius auratus</i> (300 mg/cm <sup>2</sup> )	Fontana, 1993
	<i>H. cantabrica</i>	Atlântico norte (Cantábria)		
	<i>H. villafranca</i>	Atlântico norte (Las Llanas)		
	<i>H. tricolor</i>	Atlântico norte (Las Llanas)		
<i>Isodehydro-dendrolasin</i> (8)	<i>H. cantabrica</i>	Atlântico norte (Cantábria)	-	Fontana, 1993
	<i>H. villafranca</i>	Atlântico norte (Las Llanas)		
	<i>H. villafranca</i>	Atlântico norte (Las Llanas)		
	<i>H. tricolor</i>	Atlântico norte (Las Llanas)		
<i>Pallescensin-A</i> (9)	<i>H. webbi</i>	Espanha	-	Fontana, 1994 Hochlowski, 1982
	<i>H. californiensis</i>	São Diego, Califórnia		
<i>Nakafuran-8</i> (10)	<i>H. capensis</i>	África do sul	-	McPhail, 1998 Karuso, 2002 Hochlowski, 1982
	<i>H. californiensis</i>	Golfo da Califórnia		
	<i>H. infucata</i>	Baía Kaneohe (Hawaii)		
9,10-dehydrofurodysinin (11)	<i>H. tricolor</i>	Itália	Tóxico para <i>Gambusia affinis</i> (DL50= 10 ppm) Tóxico para <i>Artemia salina</i> (DL50= 1.52 ppm) Atividade anti-alimentar contra <i>Carassius auratus</i> (100 µg/cm <sup>2</sup> )	Fontana, 1994
	<i>H. webbi</i>	Espanha		
<i>Variabilin</i> (12)				
22-deoxy-variabilin (13)	<i>H. capensis</i>	África do sul	-	McPhail, 1998
22-deoxy-23-hidroxymethyl-variabilin (14)				
<i>Ghiselinin</i> (15)	<i>H. ghiselini</i>	Golfo da Califórnia	-	Hochlowski, 1982
<i>Euryfuran</i> (16)	<i>H. californiensis</i>	São Diego, Califórnia	-	Hochlowski, 1982
	<i>H. porterae</i>	Point Loma, Califórnia		

Nota: DL –Dose letal

De seguida encontram-se as estruturas químicas dos compostos apresentados na tabela anterior, que foram isolados do género *Hypselodoris* (figura 6).



Figura 6: Metabolitos secundários isolado do género *Hypselodoris*

Como se pode observar, a variedade de compostos isolados deste género de molusco marinho é vasta, verificando-se no entanto, a predominância de compostos furano sesquiterpenos, mono ou di-substituído. Através de vários estudos, comparando o perfil de metabolitos secundários provenientes deste molusco marinho recolhidos em vários locais, conclui-se que indivíduos da mesma espécie seleccionam o seu alimento de acordo com os padrões de metabolitos secundários, observando que os *Hypselodoris* preferem presas que sintetizem furanosesquiterpenóides, como é o caso da esponja *Dysidea fragilis* (Avila *et al*, 1991; Fontana *et al*, 1993 e 1994; Hochlowski *et al*, 1992). Os furanosesquiterpenos são compostos muito abundantes no meio marinho e vastamente estudados, sendo uma das suas características o facto de serem extremamente sensíveis à luz, ao ar e ao calor, criando alguma dificuldade no estudo destes compostos (Cimino, 1977).

Neste trabalho pretendeu-se estudar, pela primeira vez, o perfil dos metabolitos secundários apresentado pelo nudibrânquio da espécie *Hypselodoris fontandraui* (Pruvot-Fol, 1951) recolhido nas águas costeiras de Portugal (figura 7). Após identificação do composto predominante proveniente desta espécie, com a colaboração da equipa internacional de Haber, foram efectuados testes sobre a sua toxicidade e capacidade dissuasora de alimento.



Figura 7: *Hypselodoris fontandraui* [1]

Até ao momento, não foi publicado nenhum estudo sobre os compostos isolados de nudibrânquios das águas costeiras portuguesas assim como não existe nenhum conhecimento sobre o perfil de metabolitos secundários presentes nesta espécie, pelo que objecto de estudo deste trabalho é pioneiro.

## 1.2. As esponjas marinhas e os seus consórcios bacterianos

Esponjas (do filo *Porifera*) são animais primitivos multicelulares. Alimentam-se de partículas orgânicas que filtram do mar, como por exemplo, fitoplâncton, bactérias, seres eucariotas e detritos. A organização morfológica (figura 8) e o modo de alimentação de uma esponja é bastante simples: através dos vários orifícios é feita a entrada de água, que será expelida pela abertura de dimensão superior, no topo da esponja (Osinga, 1999).

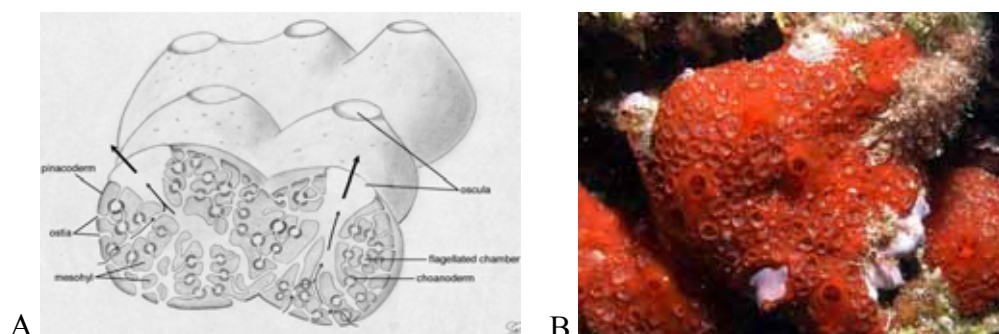


Figura 8: A) Representação esquemática de uma esponja e o fluxo de água (Taylor, 2007). B) Imagem de um espécime pertencente a género *Phorbas* (*P. topsenti*) [9]

A capacidade que as esponjas têm em filtrar uma grande quantidade de água e reter eficientemente as partículas, permite-lhes existir em ambientes pobres em nutrientes, como recifes de corais, onde são as espécies predominantes. As esponjas conseguem bombear e filtrar volumes até  $24 \text{ m}^3/\text{Kg.dia}$  de água do mar contendo cerca de  $1\text{-}5 \times 10^6$  bactérias/mL; como tal, as esponjas são as hospedeiras de uma grande comunidade de microrganismos, sendo algumas das espécies bacterianas específicas para determinadas esponjas. Os microrganismos podem compor entre 40 a 70% do volume da esponja que poderá corresponder a uma densidade de  $10^9$  microrganismos/mL de tecido de esponja, duas a quatro ordens de grandeza superior à existente na água do mar (Taylor, 2007; Li, 2009).

O facto de as esponjas serem a maior fonte de metabolitos secundários isolados de organismos marinhos (Faulkner, 2002; Blunt, 2005), associado ao conhecimento de que estes animais formam uma próxima associação com uma grande variedade de microrganismos vieram aumentar o interesse científico sobre estes organismos marinhos. De facto, animais e plantas marinhas vivem associados a microrganismos e a superfície dos seus corpos são inevitavelmente colonizados por bactérias simbiotes. Alguns organismos marinhos alojam microrganismos no seu tracto intestinal ou mesmo nos seus tecidos e células. Estas interacções esponja-microrganismo simbiote são complexas e podem ser categorizadas como mutualismo obrigatório (i.e. o simbiote tem um papel essencial no metabolismo da esponja), mutualismo facultativo (i.e. o microrganismo beneficia o seu hospedeiro mas este consegue sobreviver sem o simbiote) ou comensalismo (i.e. os simbiotes estão presentes mas sem apresentarem benefícios óbvios ao hospedeiro). Em qualquer dos casos, assume-se que a esponja oferece um “habitat” protegido ao seu simbiote. Uma outra distinção pode ser feita entre epibionte (microrganismos que vivem na superfície da esponja) e endosimbiote (microrganismos que vivem no tecido ou dentro das células das esponjas) (Osinga *et al*, 2001). Durante este trabalho, serão os microrganismos epibiontes que serão analisados.

Existem evidências que as comunidades bacterianas estão consistentemente associadas a uma espécie de esponja em particular, podendo até ocorrer a passagem destas através de várias gerações de esponjas (Wang, 2006). Verificou-se que existiam vários hospedeiros, de “habitats” distantes, que apresentavam o mesmo (ou estruturalmente semelhante) metabolito secundário, reforçando a hipótese de ser uma bactéria simbiote existente nesses hospedeiros o verdadeiro produtor deste metabolito (Hildebrand, 2004). Além disso, alguns desses compostos já seriam conhecidos e foram identificados como sendo exclusivamente de origem bacteriana (Taylor, 2007).

Na tentativa de se obter o composto activo de uma forma sustentável, o crescimento do microrganismo apresentar-se-ia como uma boa hipótese. Contudo, a fermentação de microrganismos simbiotes na ausência do seu hospedeiro é uma tarefa extremamente complexa. Tal já foi verificado embora existisse sempre a dúvida se se trataria de uma bactéria simbiote ou apenas associada (Osinga *et al*, 2001).

Uma vez que a expressão genética em bactérias está bem desenvolvida, clonar e expressar genes de bactérias simbiontes é possível e apresenta-se como uma boa alternativa ao crescimento bacteriano de simbiontes, promovendo a expressão heteróloga do gene com informação para a síntese do metabolito secundário num hospedeiro alternativo com elevada taxa de crescimento (e.g. *E. coli*). No caso de microrganismos que não se conseguem cultivar, este é o único meio de produzir os metabolitos bioactivos. Este método permite obter as quantidades de composto necessárias para os ensaios clínicos e desenvolvimento do produto como fármaco para utilização humana, ultrapassando assim a barreira que hoje existe (Hildebrand, 2004).

Os potenciais biotecnológicos destas associações esponjas-bactérias são enormes. No entanto, a transição entre a descoberta de um composto e a sua utilização em larga escala ainda não foi conseguida e continua difícil. Tecnologias como a metagenómica (que permite analisar o ADN de comunidades de bacterianas sem ser necessário isolar o microrganismos) ou o aumento substancial do conhecimento das condições de crescimento dos microrganismos apresentam-se como grandes potenciais para o desenvolvimento desta área. Ainda existe algum problema como o recurso à metagenómica, uma vez que as comunidades bacterianas existentes na esponja são muito complexas, mas tais problemas poderão ser contornados utilizando novas técnicas moleculares: electroforese em gel, “Southern blot”, “Northern blot”, “Western blot”, ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”) e PCR (“Polymerase Chain Reaction”) (Taylor *et al*, 2007).

Nos dias de hoje, as abordagens genéticas são ferramentas poderosas para a biossíntese dos produtos, assim como para se obter informações sobre o seu mecanismo (Kennedy *et al*, 2009). Poderá ocorrer uma re-orientação da pesquisa dos produtos naturais que ainda apresentem vestígios do século XIX para uma disciplina focada nos genes. Com a diminuição dos custos associados à sequenciação genómica, aumenta a possibilidade de sequenciar genomas bacterianos, providenciando deste modo a base genética para identificar e clonar novos mecanismo de produção. Juntamente com a constante evolução dos conhecimentos dos mecanismos biológicos, haverá possibilidade de se determinar mais facilmente a interferência que os produtos naturais poderão ter nas funções biológicas, abrindo portas para novos campos de pesquisa e inspirando cientistas (Pucheault, 2008).

A esponja do género *Phorbas* é muito estudada na comunidade científica devido à vasta quantidade de compostos que têm sido isolados dos seus extractos (Zhang & Capon, 2008), embora nos estudos em que se obtiveram compostos provenientes desta esponja, não tenha sido colocada a hipótese de ser uma bactéria simbiote (ou mesmo apenas associada) a real produtora destes metabolitos.

Tendo em consideração todas as questões discutidas anteriormente, a segunda parte deste trabalho teve como objectivo o estudo da comunidade bacteriana que foi possível isolar do interior da esponja *Phorbas* sp. (Faneca, 2007). Esta estirpe bacteriana faz parte dos 5% de bactérias marinhas passíveis de serem fermentadas, aumentando deste modo o potencial deste trabalho, uma vez que o principal obstáculo dos estudos de organismo marinhos, o problema do fornecimento, encontrar-se-ia, à partida, sanado. O objectivo final deste trabalho será obter um ou mais compostos purificados, que serão identificados e testados quanto à sua actividade biológica. A estrutura dos compostos iria ser comparada com as estruturas já conhecidas de compostos provenientes desta esponja, possibilitando a conclusão inequívoca de que o produtor do metabolito secundário seria o microrganismo simbiote.

## **2. Resultados e discussão**

---



Neste capítulo irão ser apresentados e discutidos os resultados do estudo dos compostos isolados dos extractos obtidos a partir do nudibrânquio *H. fontandraui* recolhidos nas ilhas Berlengas. Por técnicas de extracção foram obtidos os extractos internos e externos destes animais, fraccionando-os através de técnicas cromatográficas. O composto maioritário foi isolado obtendo-se 37% de rendimento total da extracção e uma concentração de 3,6mg/animal. Através da espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135 e bidimensional (HMQC e HMBC) determinou-se a estrutura molecular do composto e identificou-se como sendo a tavacapalascensina, isolada pela primeira desta espécie de nudibrânquio.

Neste capítulo discute-se também o estudo do perfil químico de um consórcio bacteriano extraído do interior da esponja *Phorbas* sp., recolhida na zona da Arrábida, Setúbal. As soluções provenientes da fermentação da estirpe bacteriana (sobrenadante e biomassa) foram sujeitas a técnicas de extracção e os extractos obtidos foram fraccionados por técnicas cromatográficas (coluna aberta, HPLC, de camada fina preparativa). Apresentam-se apenas resultados intermediários obtidos das técnicas de fraccionamento e purificação, não tendo sido possível a caracterização por RMN de nenhum dos compostos isolados.

Todas as operações efectuadas encontram-se descritas na Parte Experimental (capítulo 4).

### 2.1. Avaliação dos extractos do *H. fontandraui*

Os extractos do exterior foram obtidos como se descreve na Parte Experimental e analisados por c.c.f. em sílica gel de fase normal assim como por HPLC (extracto exterior e interior). Qualitativamente, o perfil cromatográfico de ambos os extractos apresentava muitas semelhanças, indicando que o perfil químico destes seria semelhante (figura 9 e 10). Pela análise da c.c.f. em *n*-hexano, verifica-se que em ambos os extractos existe uma mistura de compostos apolares, em que o composto maioritário se apresenta como o mais polar, que revela tanto com radiação UV ( $\lambda_{254\text{nm}}$ ) como com o revelador Ehrlich.

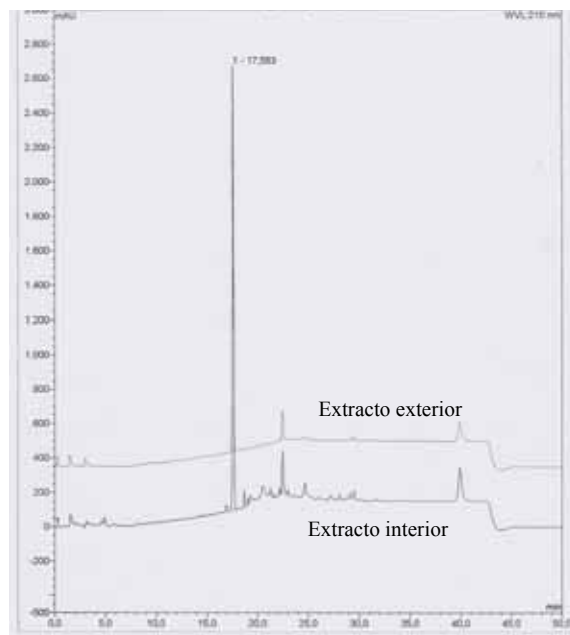


Figura 9: Cromatograma comparativo do perfil dos extractos exterior e interior do *H. fontandraui*

Em ambos os extractos verifica-se que o composto, que apresenta a mancha de cor azul da revelação com revelador Ehrlich, encontra-se sobreposto a um outro composto que revela apenas com luz UV.

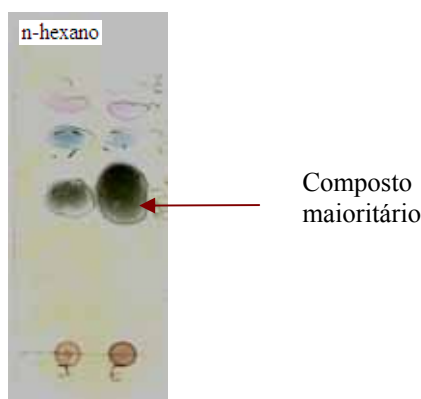


Figura 10: C.c.f em fase normal do (I) extracto interno e (E) exterior revelados com luz UV e revelador Ehrlich.

Os extractos foram fraccionados por cromatografia em coluna aberta com sílica gel 60. Os espectros de HPLC das fracções recolhidas do extracto exterior (figura 11, cromatograma 1) e do extracto interior (figura 11, cromatograma 2) permitiram verificar que, para primeiro passo de purificação, foi alcançado um bom fraccionamento dos compostos, encontrando-se o composto maioritário com um grau elevado de pureza. Com optimização das condições de eluição, prevê-se que uma nova cromatografia iria permitir purificar e isolar os restantes compostos.

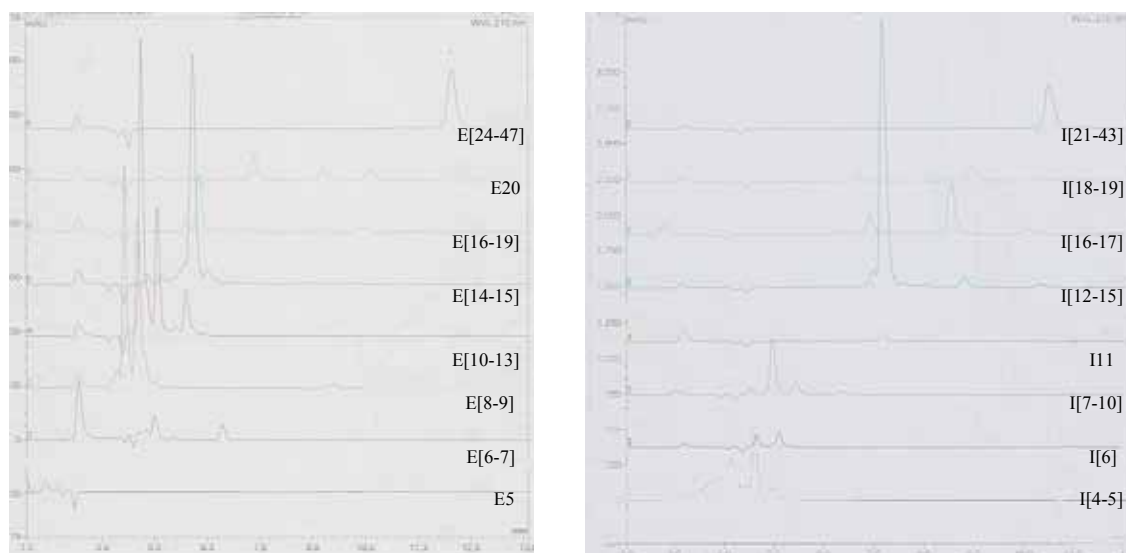


Figura 11: Cromatogramas 1 e 2 de todas as fracções do extracto externo e interno do *H. fontandraui*, respectivamente.

Comparando o cromatograma do composto maioritário de ambos os extractos (figura 12) e efectuando uma análise por HPLC de uma amostra contendo a mistura do composto maioritário de ambos os extractos (figura 13), conclui-se que estes são o mesmo produto, com  $t_R=12,5\text{min}$ , originando assim um rendimento total da extracção do composto maioritário de 37%, o que corresponde a 3,6mg/animal.

Sugere-se que seja efectuada a continuação do estudo comparativo dos dois extractos pois a possibilidade de serem os mesmos compostos é muito elevada devido à semelhança dos seus perfis cromatográficos, aumentando consideravelmente o rendimento da extracção.

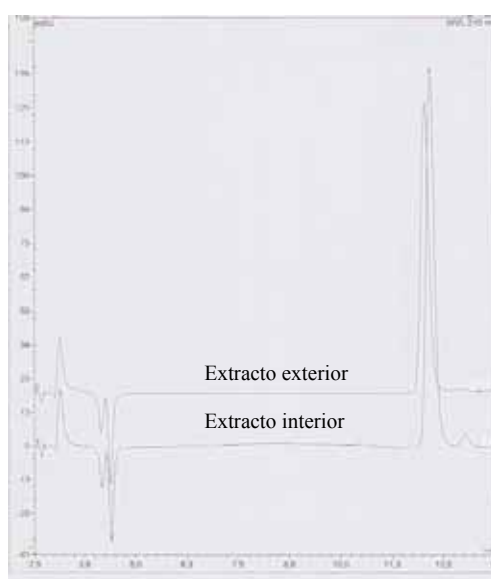


Figura 12: Cromatograma comparativo dos espectros do composto maioritário dos dois extractos do *H. fontandraui*

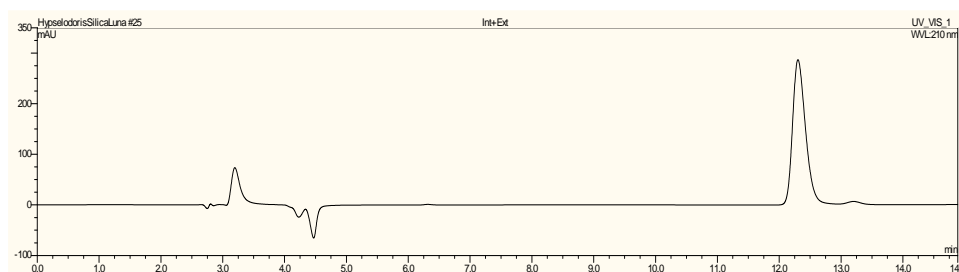


Figura 13: Cromatograma da amostra (Int+Ext) contendo o composto maioritário dos dois extractos do *H. fontandraui*

### 2.1.1 Determinação da estrutura da tavacpalascensina

A fracção E[24-47] (7,6mg) resultante do fraccionamento do extracto exterior foi analisada por RMN utilizando como solvente o benzeno deuterado ( $C_6D_6$ ) e efectuaram-se espectros de  $^1H$  (figura 14),  $^{13}C$  (figura 15), DEPT 135 (figura 16), HMQC (figura 17) e HMBC (figura 18). O espectro de COSY, por não se ter retirado informação dele uma vez que apresentava um plano de simetria imperfeito, não foi utilizado na determinação da estrutura da molécula.

Consultando vários estudos em que foram analisados várias espécies deste género de nudibrânquios (Hochlowski, 1982; Fontana *et al*, 1993; Karuso, 2002; Gaspar *et al*, 2008) espera-se, à partida, que o composto isolado seja um furanosesquiterpenóide. De facto, o espectro de RMN  $^1H$  apresenta valores de desvios químicos e de constantes de acoplamento (cf. tabela 2) próximos dos característicos de um anel furano  $\alpha,\beta$ -di-substituído:  $\delta 7,03ppm$  e  $\delta 5,94ppm$ .

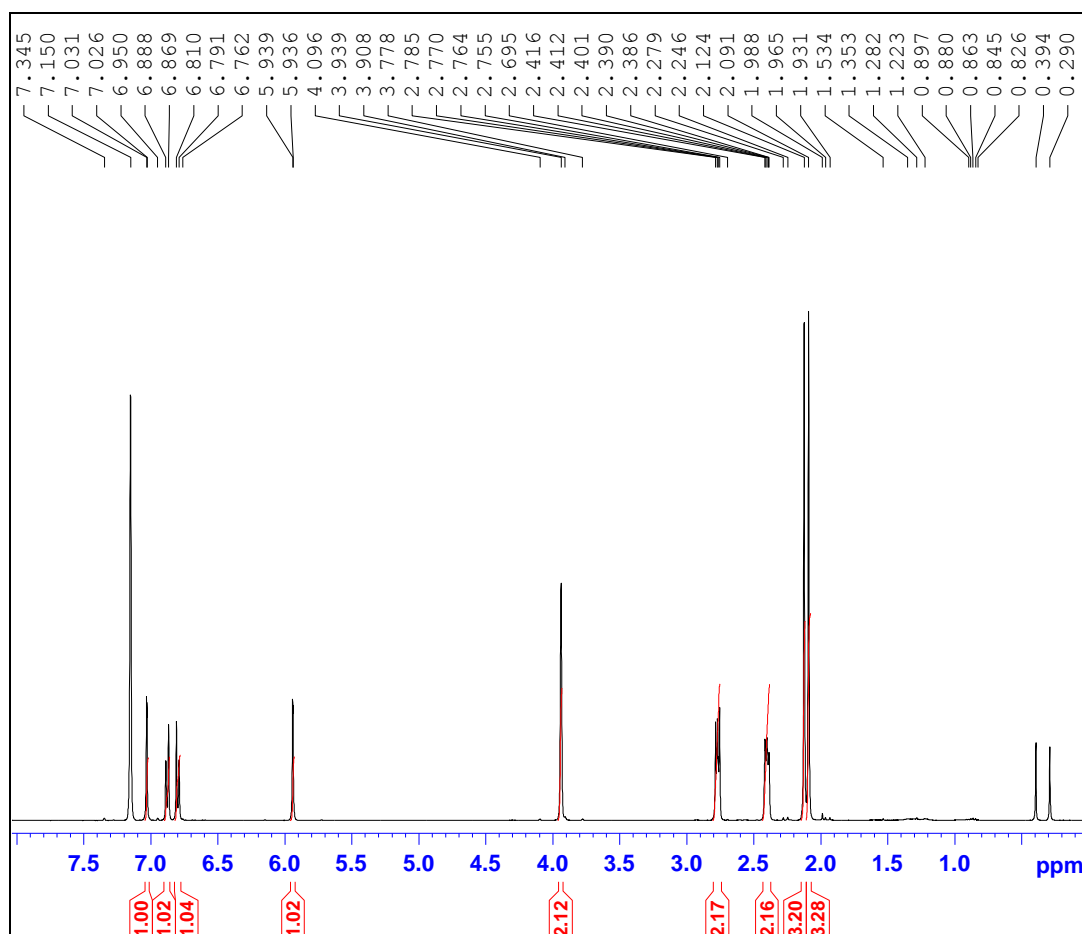


Figura 14: Espectro de  $^1H$  RMN do composto isolado do extracto externo do *H. fontandraui* ( $C_6D_6$ )

O desvio químico de um próton de um anel aromático é 7,27ppm e o valor da constante de acoplamento de dois prótons que se encontrem ligados ao anel em posição *orto* apresentam valores de  $J$  entre 6-10Hz (Silverstein & Webster, 1998). Verifica-se no espectro RMN  $^1\text{H}$  a presença de dois dubletos a  $\delta 6,88$  (1H,  $J = 7,6\text{Hz}$ ) e  $\delta 6,80\text{ppm}$  (1H,  $J = 7,6\text{Hz}$ ), pelo que se pode colocar hipótese de existir um anel aromático com dois prótons em posição *orto*.

Os dois picos com valores de desvio químicos mais baixos correspondem a dois singletos integrando três prótons, indicam a presença de dois grupos metilo ligados a carbonos quaternários cujos hidrogénios são semelhantes. De acordo com Silverstein & Webster (1998), o desvio químico característicos de um grupo metilo ligado a um anel aromático é  $\delta \sim 2,2\text{ppm}$ , pelo podemos colocar a hipótese de termos presente dois grupos metilo ocupando duas das quatro posições disponíveis.

Os restantes picos encontram-se na região dos prótons ligados a carbonos alifáticos ( $\delta 3,92$ ;  $2,77$  e  $2,40\text{ppm}$ ) correspondendo a dois prótons cada um, pelo que se espera a presença de três grupos metileno. Uma vez que se pressupõe a existência de um anel furano di-substituído, pode formular-se a hipótese de serem estas cadeias alifáticas a efectuar a ligação entre este anel e o aromático.

Do espectro de  $^{13}\text{C}$  retira-se a informação da existência de 15 carbonos. Fazendo a análise paralela com o espectro de DEPT 135, conclui-se que seis destes são carbonos com hibridação  $\text{sp}^3$  ( $\delta 148,6$ ;  $139,5$ ;  $138,3$ ;  $133,3$ ;  $132,2$  e  $117,9\text{ppm}$ ). Os carbonos de grupos metileno são fáceis de identificar no espectro DEPT 135 e correspondem aos carbonos com desvio químico  $\delta 28,1$ ;  $24,4$  e  $27,4\text{ppm}$ , que se encontrarão ligados aos prótons de grupos metilenos já identificados em RMN  $^1\text{H}$ .

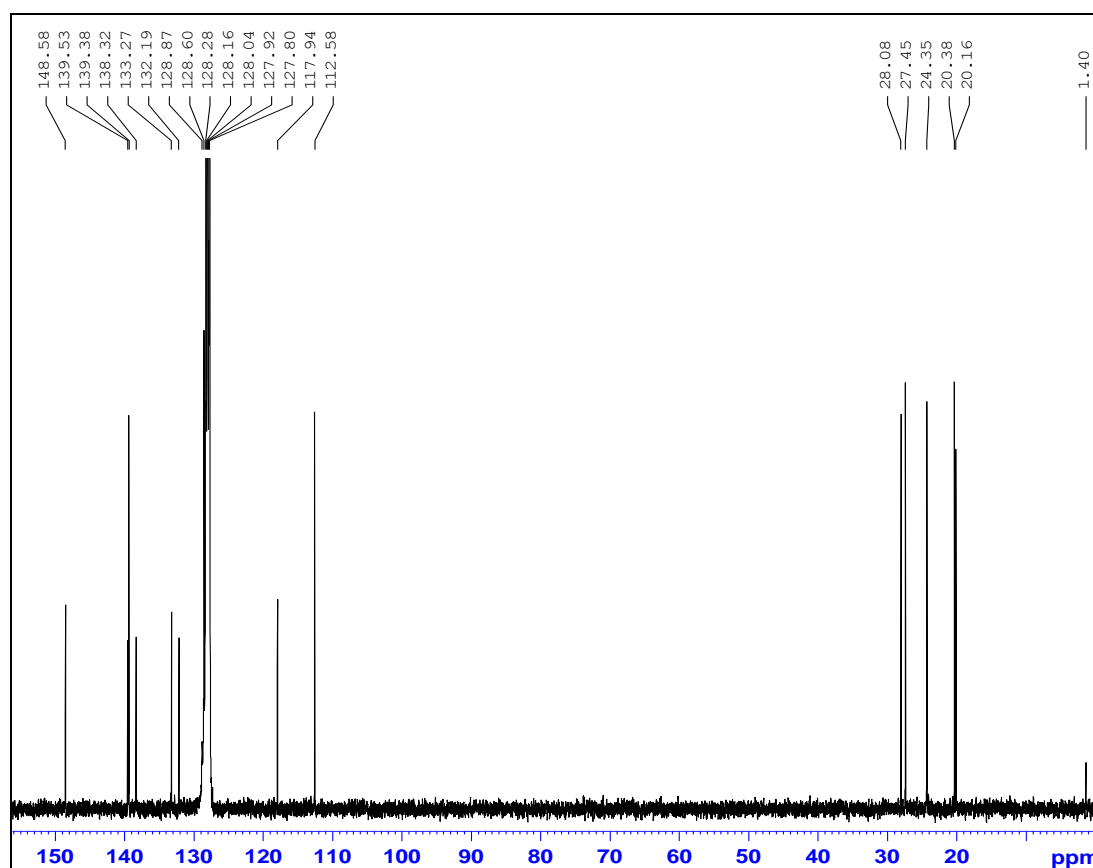


Figura 15: Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto isolado do extracto externo do *H. fontandraui* ( $\text{C}_6\text{D}_6$ )

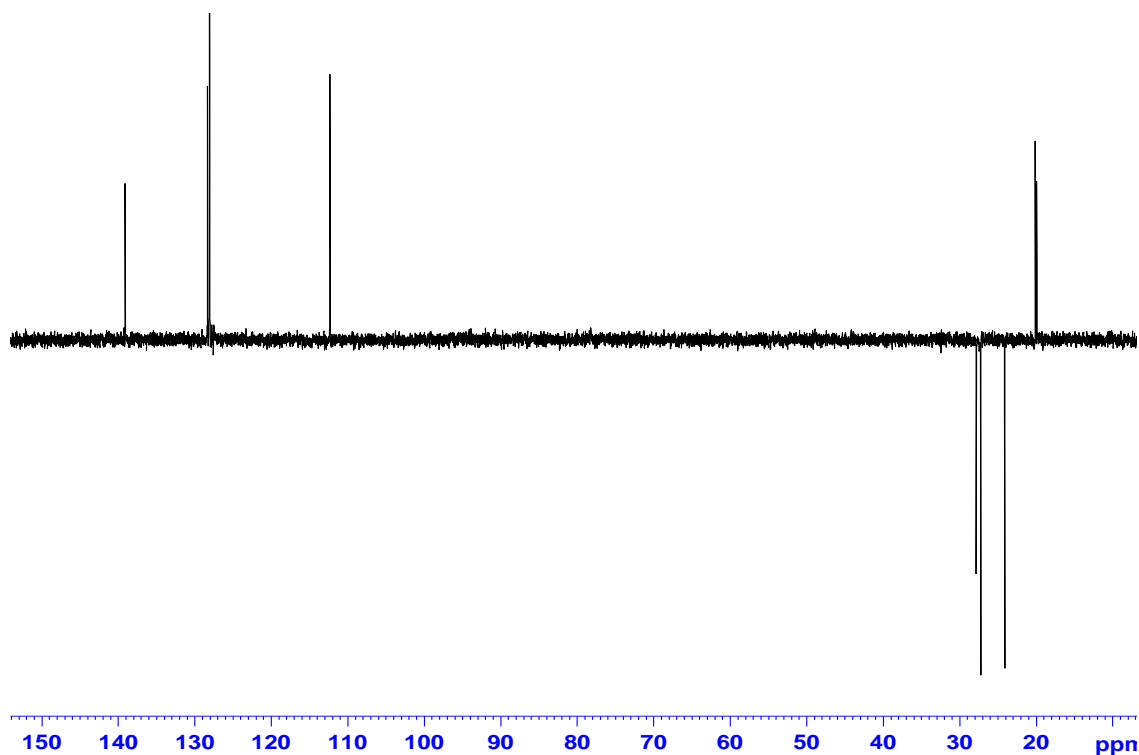


Figura 16: Espectro de DEPT 135 do composto isolado do extracto externo do *H. fontandraui* ( $\text{C}_6\text{D}_6$ )

Para determinar as ligações prótão-carbono (H-C) recorre-se ao espectro de correlação HMQC.

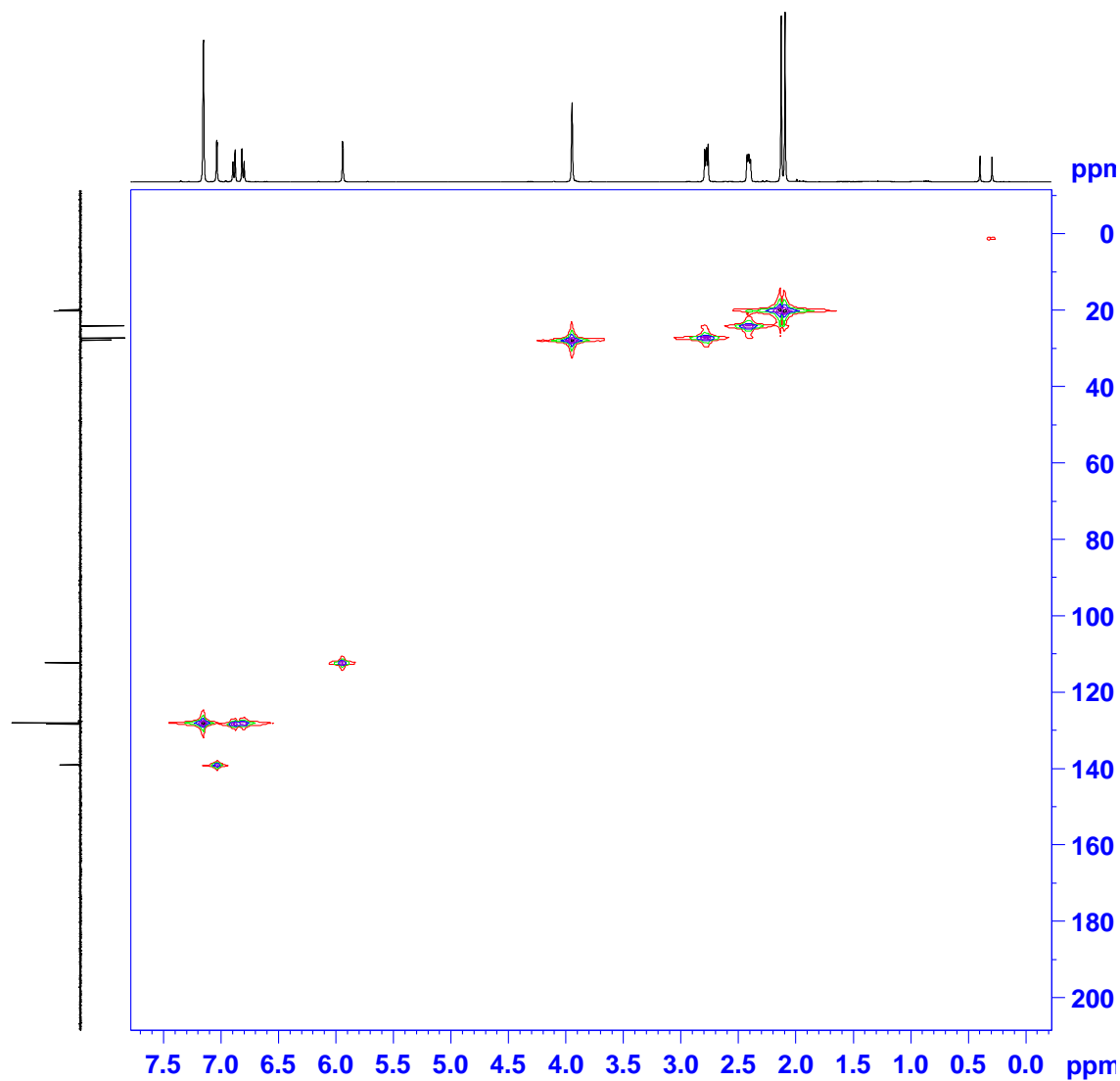


Figura 17: Espectro de HMQC do composto isolado do extracto externo do *H. fontandraui* ( $C_6D_6$ )

Neste espectro, os acoplamentos H-C a longas distâncias são eliminados (i.e., duas e três ligações), preservando-se o acoplamento de H-C directamente ligados. Retira-se então a seguinte informação:



- Os carbonos  $\delta 139,5\text{ppm}$  e  $112,6\text{ppm}$  encontram-se ligados aos hidrogénios com  $\delta 7,03\text{ppm}$  e  $5,94\text{ppm}$ , respectivamente, já identificados como fazendo parte do anel de furano;
- O carbono com  $\delta 128,3\text{ppm}$  encontra-se ligado ao hidrogénio com  $\delta 6,80\text{ppm}$  enquanto que o carbono com  $\delta 128,6\text{ppm}$  apresenta uma ligação ao protão com  $6,88\text{ppm}$ , já identificados como fazendo parte do anel aromático;
- O carbono de desvio químico mais baixo, correspondente a um grupo metilo ( $\delta 20,2\text{ppm}$ ) encontram-se ligado ao protão  $\delta 2,12\text{ppm}$ , enquanto que o carbono com desvio químico de  $20,4\text{ppm}$  encontra-se ligado ao hidrogénio de sinal  $\delta 2,09\text{ppm}$ .
- Os três carbonos dos três grupos metilenos correspondem aos carbonos com desvios químicos de  $\delta 28,1$ ;  $27,5$  e  $24,4\text{ppm}$  e encontram-se directamente ligados aos hidrogénios com desvios químicos de  $3,94$ ;  $2,77$  e  $2,40\text{ppm}$ , respectivamente.

Através do espectro de correlação bidimensional HMBC serão analisadas as correlações  $^2J$  e  $^3J$ . Ao fazer a interpretação deste espectro é necessário ser cauteloso uma vez que, por vezes, nem todas as interacções a 2 e 3 ligações estão presentes.

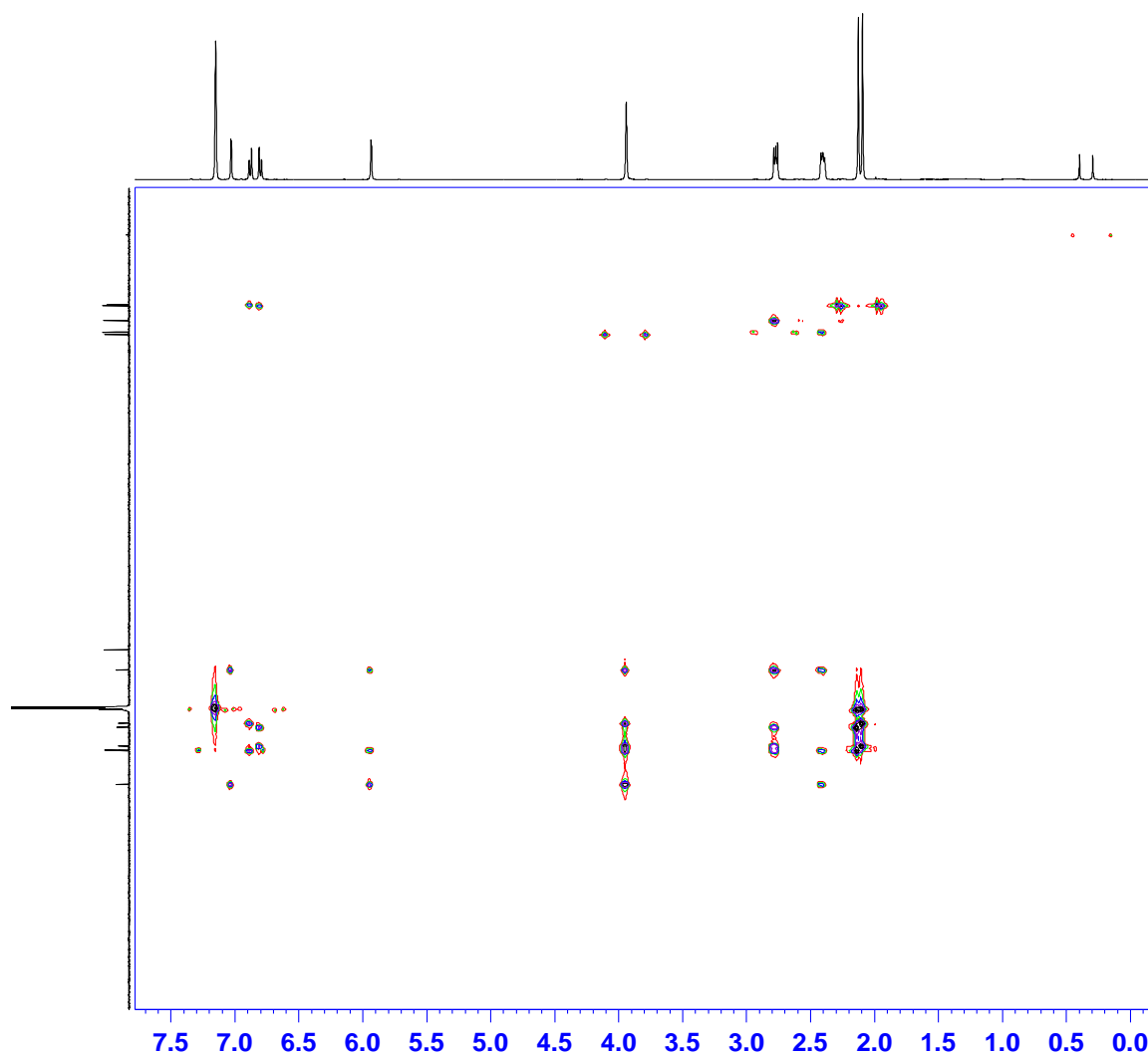


Figura 18: Espectro de HMBC do composto isolado do extracto externo do *H. fontandraui*(C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>)

Observa-se que:

1) Os carbonos das cadeias alifáticas com desvio químico de  $\delta 24,4\text{ppm}$  e  $27,4\text{ppm}$  apresentam correlações com os protões de  $\delta 2,77\text{ppm}$  e  $2,40\text{ppm}$ , respectivamente. Como se tinha concluído pelo espectro HMQC que as ligações entre estes carbonos alifáticos eram:  $\text{C}_{27,5\text{ppm}} - \text{H}_{2,77\text{ppm}}$  e  $\text{C}_{24,4\text{ppm}} - \text{H}_{2,4\text{ppm}}$ , pode-se confirmar a ligação  $\text{CH}_2 - \text{CH}_2$  formada por estes átomos.

2) Existe correlação entre o carbono do grupo metilo ( $\delta 20,4\text{ppm}$ ) com o hidrogénio que se encontra ligado ao anel aromático ( $\delta 6,80\text{ppm}$ ). Também ligado ao anel aromático, o protão em posição *orto* ( $\delta 6,88\text{ppm}$ ) apresenta correlação com o carbono do

outro grupo metilo ( $\delta 20,2\text{ppm}$ ). Este próton apresenta também correlação com o carbono com desvio químico de  $\delta 132,2\text{ppm}$  e  $139,4\text{ppm}$ .

3) O carbono do restante grupo  $\text{CH}_2$  ( $\text{C}_{28,1\text{ppm}} - \text{H}_{3,92\text{ppm}}$ ) não apresenta quaisquer correlações.

4) O carbono que apresenta correlações com o hidrogénio do grupo  $\text{CH}_2$  e com o hidrogénio com desvio químico de  $\delta 6,88\text{ppm}$  é o carbono com  $\delta 132,2\text{ppm}$ . Conjugando os pontos 2, 3 e 4, uma hipótese para a estrutura parcial da molécula apresenta-se na figura 19.

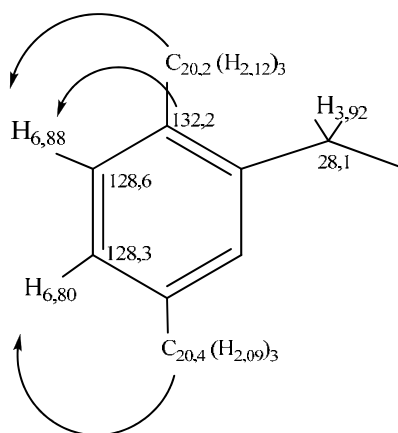


Figura 19: Estrutura parcial do composto

5) Observando os prótons ligados ao anel furano, verifica-se a existência de correlações destes com os carbonos com desvio químico  $\delta 148,6\text{ppm}$  e  $\delta 117,9\text{ppm}$ , concluindo-se que estes são os restantes carbonos do anel de furano. A cadeia alifática estabelece então a ligação entre o anel de furano e o aromático. Existindo correlação entre o carbono com sinal  $\delta 148,6\text{ppm}$  e o hidrogénio com sinal  $\delta 2,40\text{ppm}$  mas não com o hidrogénio com  $\delta 2,77\text{ppm}$ , este hidrogénio e o carbono a  $\delta 148,6\text{ppm}$  encontram-se a mais de 3 ligações de distância, sendo possível completar a estrutura anteriormente apresentada confirmada pelas restantes correlações entre os átomos (figura 20).

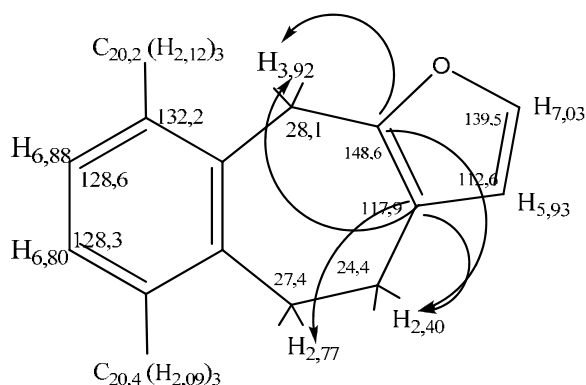


Figura 20: Estrutura parcial do furanosesquiterpeno e a algumas correlações chave observados no espectro HMBC

6) Para identificar os restantes carbonos quaternários, observa-se que existe correlação entre o hidrogénio de sinal  $\delta 6,80\text{ppm}$  com os carbonos com sinal a  $\delta 133,3\text{ppm}$  e  $\delta 138,3\text{ppm}$ , enquanto que o hidrogénio  $\delta 6,88\text{ppm}$  se correlaciona com os carbonos com desvios químicos de  $\delta 139,4\text{ppm}$  e  $\delta 132,2\text{ppm}$ . Tendo em conta a estrutura criada, pode-se comprovar as restantes correlações do composto agora estruturado (figura 21).

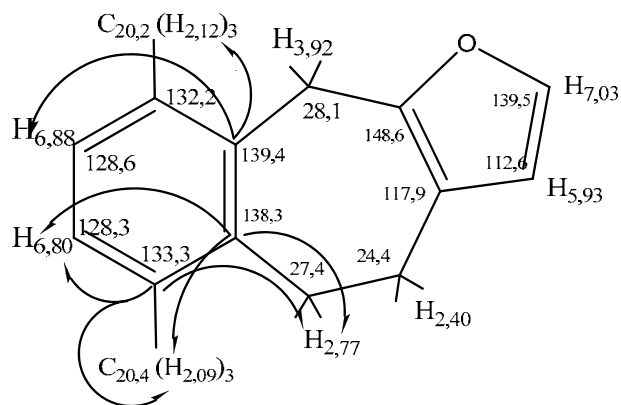
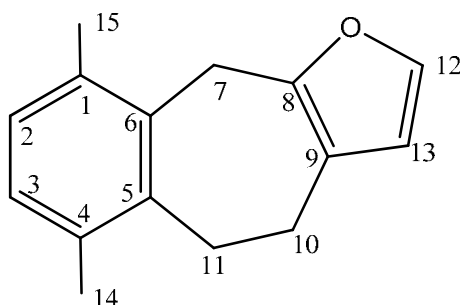


Figura 21: Estrutura do furanosesquiterpeno evidenciando os desvios químicos e algumas correlações obtidas pelo espectro de HMBC.

A tabela 2 pretende resumir todos os dados dos espectros analisados para se obter a estrutura química do furanosesquiterpeno isolado (figura 22).

Tabela 2: Dados de RMN da tavacpalascensina

Posição	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^1\text{H} (J\text{ Hz})^b$	HMBC
1	132,2 <b>qC</b>	-	H-2; H-7; H <sub>3</sub> -15
2	128,6 <b>CH</b>	6,88 d (7,6)	H <sub>3</sub> -15
3	128,3 <b>CH</b>	6,80 d (7,6)	H <sub>3</sub> -14
4	133,3 <b>qC</b>	-	H-3; H-11; H <sub>3</sub> -115
5	138,3 <b>qC</b>	-	H-3; H <sub>2</sub> -7; H <sub>2</sub> -11; H <sub>3</sub> -14
6	139,4 <b>qC</b>	-	H-2; H-7; H <sub>2</sub> -11; H <sub>3</sub> -15
7	28,1 <b>CH<sub>2</sub></b>	3,92 s	-
8	148,6 <b>qC</b>	-	H-13; H-12; H <sub>2</sub> -7; H <sub>2</sub> -10
9	117,9 <b>qC</b>	-	H-13; H-12; H-7; H <sub>2</sub> -11; H <sub>2</sub> -10
10	24,4 <b>CH<sub>2</sub></b>	2,40 m	H <sub>2</sub> -11
11	27,4 <b>CH<sub>2</sub></b>	2,77 m	H <sub>2</sub> -10
12	139,5 <b>CH</b>	7,03 d (2,0)	H-13; H-11
13	112,6 <b>CH</b>	5,94 d (1,2)	-
14	20,4 <b>CH<sub>3</sub></b>	2,09 s	H-3
15	20,2 <b>CH<sub>3</sub></b>	2,12 s	H-2

<sup>a</sup> Através do espectro DEPT 135 e HMQC<sup>b</sup> Através do espectro HMQCFigura 22: Estrutura química do furanosesquiterpeno isolado do *H. fontandraui*

Efectuou-se a pesquisa deste composto, com forma molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}$  em diversas base de dados e literatura. Obteve-se informações sobre este composto previamente descoberto e estudado sob o nome de *tavacpalascensina*.

Este composto foi isolado primeiramente por Guella (1985) a partir da esponja *Dysidea fragilis* recolhida no Mediterrâneo e posteriormente sintetizada por Ho & Li (1999). Os resultados da espectroscopia de RMN obtidos por estas equipas encontram-se de acordo com os obtidos nestes trabalho.

Uma vez que a tavacpalascensina foi obtida do extracto interior (incluindo o seu aparelho digestivo), tal é indicativo de este produto ser proveniente da dieta deste nudibrânquio, o que foi o concluído noutros estudos sobre os compostos isolados dos *Hypselodoris* (Avila, 1991; Fontana, 1993). Seria interessante que, numa futura recolha

destes espécimes, fossem recolhidas também amostras das esponjas presentes no seu “habitat” e confirmar (ou não) a presença da tavacpalascensina nessas esponjas, concluindo de forma inequívoca sobre a origem deste metabolito.

Com a parceria do Istituto di Chimica Biomolecolare realizaram-se ensaios relativos à ictiotoxicidade e palatibilidade contra o camarão *Palaemon elegans*. Demonstrou-se que a tavacpalascensina encontra-se acumulada em elevadas concentrações no manto do animal ( $\pm 25,98\text{mg/mL}$ ), uma vez que esta espécie não apresenta FDM, e é sem dúvida um composto utilizado como primeira linha de defesa do molusco relativamente aos predadores, demonstrando actividade dissuasora mesmo em concentrações tão baixas como  $1\text{mg/mL}$ . Sugere-se testar este composto versus alguns microrganismos patogénicos (e.g. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*) assim como determinar se terá alguma actividade anti-cancerígena.

Este trabalho foi o primeiro a debruçar-se sobre o estudo dos metabolitos secundários derivados do nudibrânquio *H. fontandraui* recolhidos na costa portuguesa e pela primeira vez, foi obtido o composto tavacpalascensina a partir destes moluscos.

## 2.2. Estudo dos metabolitos secundários do consórcio bacteriano

No trabalho efectuado por Faneca (2007), foi isolada uma estirpe do interior da esponja *Phorbas* sp., designada #P1, Gram negativa (figura 23), apresentando uma boa taxa de crescimento. Foi sugerido pelos investigadores a cargo deste projecto que esta estirpe apresentava características do género *Vibrio*, existente abundantemente em ambientes marinhos mas a sua identificação ainda não foi efectuada.

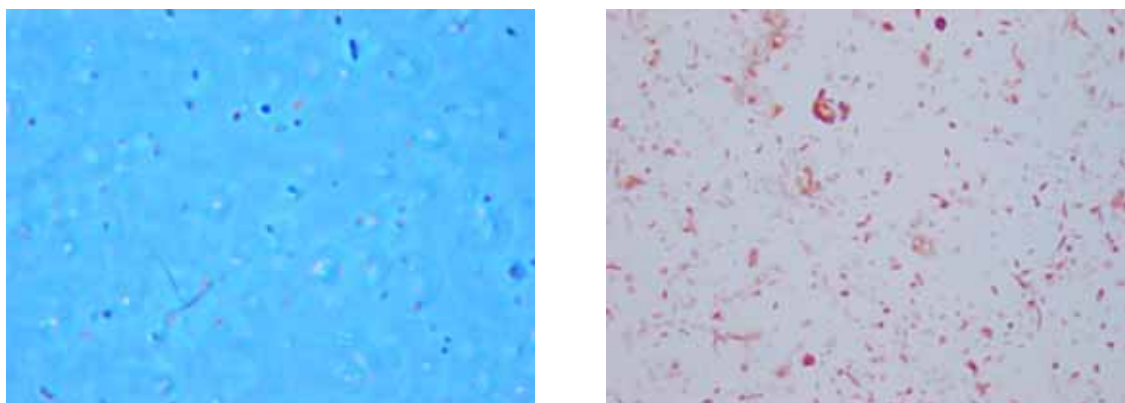


Figura 23. Estirpe #P1 apresentando forma de bastonete e respectiva coloração de Gram (ampliação 1000X)

Da fermentação desta estirpe obtiveram-se 800mL de suspensão da biomassa e 2750mL de sobrenadante.

A biomassa e o sobrenadante foram extraídos selectivamente através de solventes tendo em conta as diferenças de polaridades. Escolheram-se os solventes éter etílico para metabolitos de baixa polaridade, como é o caso dos terpenos, e diclorometano para recolha dos compostos de polaridade média. Obtiveram-se as seguintes massas:

Tabela 3: Massa dos extractos obtidos após extracção com éter etílico e diclorometano

<i>Extracto bacteriano</i>	<i>Solvente utilizado</i>	<i>Designação</i>	<i>Massa</i>
<i>Biomassa</i>	éter etílico	B/EE	66,31 mg
	diclorometano	B/D	75,10 mg
<i>Sobrenadante</i>	éter etílico	S/EE	225,1 mg

De modo avaliar o número e a polaridade dos compostos presentes em ambos os extractos, efectuaram-se c.c.f. utilizando gradientes de solventes. A figura 24 apresenta os cromatogramas dos extractos de éter obtidos a partir da biomassa e do sobrenadante, enquanto que a figura 25 mostra o perfil cromatográfico do extracto de diclorometano obtido a partir da biomassa.

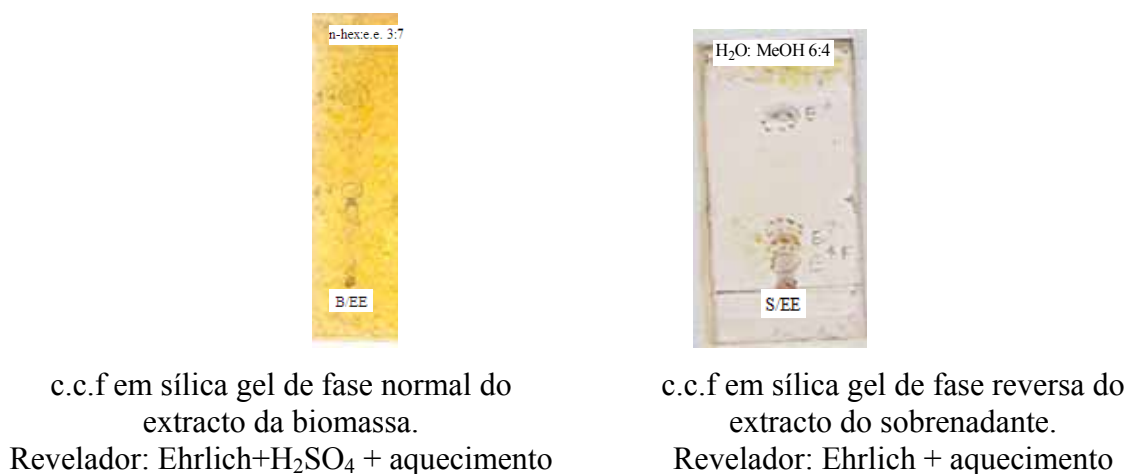


Figura 24: C.c.f. dos extractos de éter da biomassa B/EE e do sobrenadante S/EE.



Figura 25: C.c.f em sílica gel de fase normal do extracto da biomassa extraído com diclorometano B/D. Revelador: Ehrlich+H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + aquecimento

Observa-se que os extractos de éter são mais complexos, apresentando três manchas bem definidas que revelam com revelador Ehrlich (E<sup>+</sup>). Este revelador é utilizado para a detecção de compostos contendo azoto, como indóis, aminas e compostos contendo anéis de furano. Observa-se que existe sobreposição destes com outros compostos que apenas são visíveis na luz UV (na figura 24 indicados a tracejado).

O extracto de diclorometano da biomassa apresenta apenas uma única mancha que revela apenas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



Para eliminação de qualquer probabilidade dos compostos observados serem provenientes do meio de cultura utilizado na fermentação, avaliou-se o perfil cromatográfico do meio de cultura efectuando-se uma c.c.f. em sílica gel de fase normal. Contudo, não se observou qualquer resultado, pelo que se pôde excluir o meio de cultura como sendo um contaminante.

Para fraccionamento dos extractos foram usadas várias técnicas cromatográficas, cujo esquema seguinte pretende resumir (figura 26).

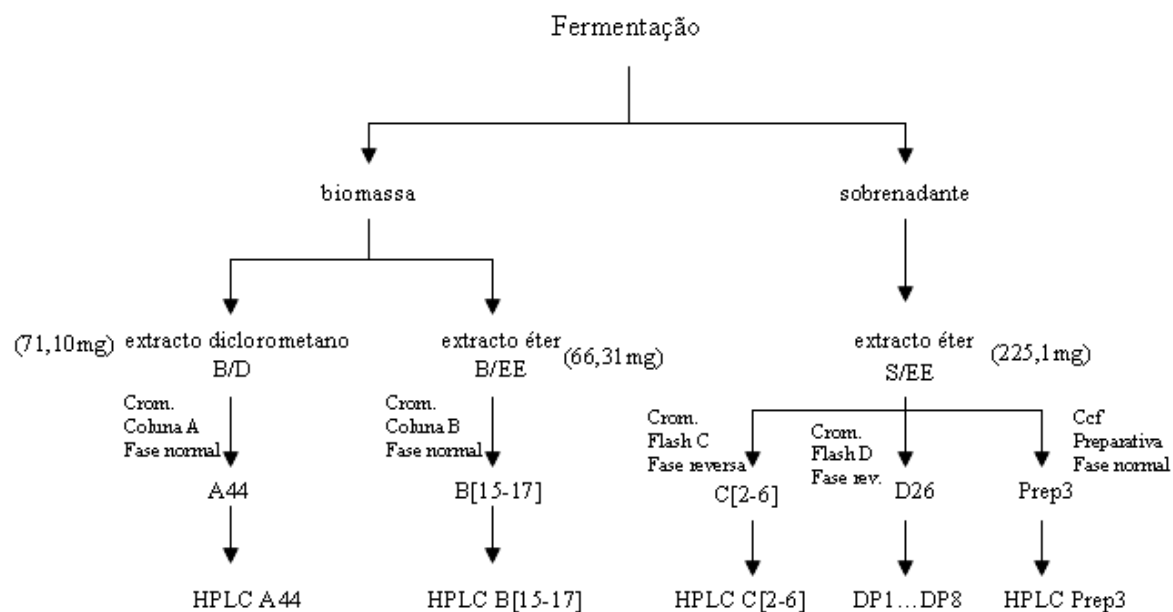


Figura 26: Esquema dos passos de purificação dos compostos provenientes do consórcio bacteriano

### 2.2.1. Estudo do extracto de diclorometano obtido a partir da biomassa (B/D)

O extracto B/D foi submetido a fraccionamento através de cromatografia em coluna preenchida com sílica gel 60 (cc A). A fracção A[2-19] isolada da coluna cromatográfica, correspondente ao composto menos polar do extracto, foi analisada por HPLC, tendo-se concluído que o composto se tinha degradado, talvez devido a impurezas existentes no solvente.

A fracção mais polar proveniente do fraccionamento do extracto B/D, a amostra A44 (13,38 mg), foi analisada por HPLC equipado com uma coluna de fase reversa (cf. figura 29, capítulo 6.1). O resultado obtido desta análise não se revelou informativo, obtendo-se vários picos e com baixa resolução, pelo que o programa de execução teria de

ser optimizado, mas por dificuldades logísticas, uma vez que o HPLC não se encontrava apenas dedicado a este projecto, não foi possível concluir esta fase do trabalho.

### **2.2.2. Estudo do extracto de éter obtido a partir da biomassa B/EE**

No perfil do cromatograma deste extracto verificou-se a existência de um composto que apresentava uma mancha com  $R_f$  elevado no sistema de eluente escolhido (figura 24), que aparentava ser fácil de isolar e purificar. Ao preparar a amostra para a cromatografia em coluna aberta, semanas após a análise qualitativa por c.c.f., observou-se a ausência da mancha observada anteriormente. Para tentar observar esse composto: i) utilizou-se um vasto leque de solventes e de gradientes de modo a cobrir todas as categorias de polaridade; ii) fez-se novo revelador Ehrlich; iii) efectuou-se uma nova extracção da fase aquosa resultante da primeira extracção com éter etílico, repetindo todas as etapas para se atingir um novo extracto B/EE. Em nenhuma destas situações o composto voltou a ser visível, concluindo-se que este se tenha degradado e que tenha sido extraído totalmente quando se efectuou a primeira extracção de éter.

Assim, procedeu-se ao isolamento dos restantes compostos por cromatografia em coluna aberta preenchida com sílica gel 60 (cc B).

A fracção que apresentava um composto que revelava com o revelador Ehrlich e que aparentava encontrar-se puro (B[15-17] - 2,65mg) foi analisada por HPLC. No cromatograma (figura 30, capítulo 6). Identificaram-se quatro picos bem resolvidos, tendo-se recolhido separadamente as fracções correspondentes a cada tempo de retenção ( $t_R$ ).

Devido a problemas instrumentais, o trabalho teve de ser interrompido e infelizmente, por razões alheias à executante, as amostras foram perdidas e não foi possível retomar este trabalho.

### **2.2.3. Estudo do extracto de éter obtido a partir do sobrenadante (S/EE)**

Efectuou-se uma cromatografia em coluna de média pressão pré-empacotada de fase reversa (cc C) em que 70mg do extracto s/EE foi analisado. A separação dos compostos Ehrlich positivos foi obtida com relativo sucesso, como se pode observar pelo perfil cromatográfico da fracção C[2-6] (figura 27).



Figura 27: C.c.f. sílica gel de fase reversa (1) C[2-6] e (2) C[7-38]. Revelador: Ehrlich+aquecimento.

A purificação por HPLC da fracção C[2-6] potenciava bons resultados. No entanto, por motivos de ordem técnica, não foi possível efectuar esta análise, pelo que se sugere no futuro a continuação do estudo desta e das restantes fracções.

Durante a preparação do extracto de éter para a realização da cromatografia discutida anteriormente, verificou-se que parte da amostra precipitou no sistema de eluentes utilizado. Assim, cromatografou-se apenas a parte solúvel enquanto que a parte insolúvel foi re-dissolvida e aplicada numa placa de cromatografia em camada fina preparativa de fase normal, verificando-se que esta amostra não apresentava o composto que originava a mancha mais polar apresentada pelo extracto de éter S/EE. Esta técnica cromatográfica é já pouco utilizada hoje em dia uma vez que técnicas mais eficientes se encontram disponíveis. No entanto, quando o objectivo do processo de purificação é apenas obter uma quantidade de composto suficiente para conseguir elucidação sobre a estrutura química do mesmo, é um modo rápido, fácil e económico para o atingir. Contudo, apresenta rendimentos muito baixos, havendo uma grande perda de massa durante o processo de desadsorção e recuperação dos produtos fraccionados. De facto, as massas que se obtiveram foram muito reduzidas, obtendo-se rendimentos entre 1,3-2,2% (cf. tabela 16, capítulo 4). Por c.c.f de fase normal verificou-se que dos dois compostos que revelavam com revelador Ehrlich, apenas o composto com  $R_f=0,55$  aparentava encontrar-se puro. Efectuou um espectro de RMN deste composto mas devido à baixa concentração da amostra, apenas se conseguiu observar distintamente o sinal do solvente. Por conseguinte, tendo à disposição outras técnicas cromatográficas com melhores rendimentos e resolução, irá optar-se por elas quando possível.

O restante extracto de éter proveniente do sobrenadante foi fraccionado por cromatografia em coluna de média pressão pré-empacotada de fase reversa (cc D).

Obtiveram-se várias fracções que foram agrupadas de acordo com o seu perfil cromatográfico. Seleccionaram-se quatro fracções (D8, D16, D25 e D26] – figura 28) que, quer pela quantidade de massa, quer pelo perfil cromatográfico que apresentavam, seriam boas candidatas à purificação e isolamento dos seus componentes por HPLC.



Figura 28: C.c.f. sílica gel de fase reversa das fracções D26, D25, D16 e D8. Revelador: Ehrlich+ aquecimento

A amostra D26 foi fraccionada por HPLC equipada com uma coluna de fase reversa, obtendo-se o cromatograma apresentado na figura 31 (capítulo 6) tendo como objectivo o isolamento do composto E<sup>+</sup>. Recolheram-se as fracções D<sub>P1</sub> até D<sub>P8</sub> de acordo com os seus tempos de retenção nas condições experimentais utilizadas. Essas fracções foram concentradas e analisadas por c.c.f. de fase normal. Verificou-se que:

- os compostos D<sub>P5</sub> e D<sub>P7</sub> são dois compostos visíveis à luz UV e encontravam-se cromatograficamente puros;
- o composto D<sub>P8</sub> é o composto que revela positivamente com Ehrlich e também se encontra cromatograficamente puro;
- os restantes compostos não se tornaram visíveis com luz UV ou com revelador Ehrlich.

Continuou-se o fraccionamento da amostra D26 e repetiu a c.c.f. de fase normal das fracções de todas as fracções recolhidas. Verificou-se que as manchas correspondentes aos compostos das fracções isoladas deixaram de se observar e apenas se verificava a existência de uma mancha amarelada comum a todas as fracções, sugerindo a degradação dos compostos isolados.

Para se obter respostas sobre o que terá causado esta transformação/degradação, efectuou-se análises por HPLC, equipado com a coluna de fase reversa, de todas as fracções previamente isoladas. Verificou-se o aparecimento de um novo pico com  $t_R \approx 3,9$  min, comum a todos, e ao mesmo tempo ao desaparecimento dos picos com os  $t_R$  característicos dos compostos isolados (figura 32, capítulo 6). Para determinar em qual o passo da purificação se teria introduzido o contaminante, analisou-se a fracção  $D_{P7}$  nas soluções presentes nas operações que são efectuadas após a cromatografia: a) eluente utilizado na cromatografia (MeOH/H<sub>2</sub>O 45:55); b) 100% H<sub>2</sub>O (após evaporação de MeOH); c) na fase aquosa (após extracção líquido-líquido com éter etílico) e d) na fase orgânica. Os vários espectros encontram-se resumidos na figura 33 (capítulo 6).

Observa-se a presença do composto com  $t_R \approx 4$  min apenas na fase orgânica. Nos passos anteriores, o composto correspondente à fracção  $D_{P7}$  ( $t_R \approx 8,7$  min) encontra-se isolado, sem contaminantes e ausente na fase aquosa, como seria expectável. Uma vez que as alterações apenas se verificam depois de se adicionar éter, experimentou-se efectuar a extracção líquido-líquido utilizando éter previamente destilado e analisou-se por HPLC amostras em que foi utilizado éter destilado e não destilado (figura 34, capítulo 6). Como resultado, verificou-se a ausência do “contaminante”, pelo que se pôde concluir que era o éter utilizado para as extracções que continha impurezas (as mais habituais são a água, o etanol ou aldeídos) que degradavam os compostos isolados.

A purificação da amostra D26 foi concluída mas as massas obtidas foram muito reduzidas, entre as 0,1mg e as 0,7mg, devido às análises cromatográficas imprevistas que foram efectuadas. Com o intuito de determinar a estrutura química dos compostos isolados, submeteram-se as fracções a espectroscopia RMN 600MHz, apenas disponível no laboratório italiano do Istituto di Chimica Biomolecolare (ICB).

Infelizmente, os espectros RMN não devolveram nenhum resultado conclusivo, não sendo possível concluir sobre a estrutura química de nenhum dos compostos isolados, nomeadamente do composto  $E^+$  ( $DP_8$ ). Tal poderá ter origem na degradação dos compostos durante o transporte, ou simplesmente devido às massas reduzidas obtidas. Num novo estudo deste extracto, em que todos os passos já se encontrem optimizados, espera-se obter um melhor resultado.

Por existir um tempo finito para a elaboração deste projecto, não foi possível estudar detalhadamente todos os compostos que se foram conseguindo isolar e purificar. Obtiveram-se extractos muito complexos que apresentavam uma grande variedade de

compostos. Alguns deles foram seleccionados para se efectuar um estudo mais detalhado em detrimento dos restantes, podendo ser algum desses preteridos um composto interessante e/ou desconhecido.

Algumas das operações de isolamento/purificação ficaram pendentes devido a indisponibilidade de equipamento ou a limitações de tempo. Sugerem-se de seguida alterações ou melhoramentos ao protocolo seguido de modo a se poderem otimizar os resultados:

- Quando se efectuar nova fermentação da estirpe #P1, irão obter-se novos extractos. Ao analisar-se o extracto de éter da biomassa deverá isolar-se de um modo consecutivo o composto menos polar, evitando que este se degrade;
- Utilizar sempre solventes recém destilados e operar com cuidado para evitar contaminações;
- O fraccionamento do sobrenadante com diclorometano ou outro solvente mais polar uma vez que neste trabalho apenas foi extraído com éter;
- Da cromatografia em coluna A do extracto de diclorometano proveniente da biomassa B/D recolheu-se a fracção A44 que aparentava conter ainda muitos compostos. A análise por HPLC não apresentou resultados satisfatórios e não foi possível repetir este ensaio, pelo que se sugere a repetição do seu estudo;
- Submeteu-se o extracto de éter proveniente da biomassa B/EE a cromatografia em coluna aberta (cc B) e isolaram-se várias fracções. A fracção B[15-17] foi fraccionada por HPLC. No cromatograma observaram-se quatro picos cujos os compostos que lhes dão origem foram isolados, pelo que se sugere a repetição do processo experimental de modo a voltar-se a obter esses compostos em maior quantidade e de ser possível a sua caracterização;
- As fracções separadas por cromatografia em coluna C do extracto de éter proveniente do sobrenadante S/EE não foram analisadas. Verificava-se a presença de compostos que revelavam com revelador Ehrlich e com algum grau

de pureza pelo que seria importante o estudo mais aprofundado destes compostos;

- Ainda no estudo do extracto S/EE, efectuou-se uma cromatografia em camada fina preparativa, conseguindo-se separar seis compostos, em que apenas um deles foi analisada por espectroscopia de RMN. Sugere-se que o mesmo seja feito aos restantes compostos;
- Da cromatografia em coluna pré-empacotada D, apenas foi analisada uma das quatro fracções que evidenciavam potencial. As restantes poderão conter algum composto interessante.

Uma outra abordagem que se poderia efectuar para optimização de resultados provenientes do consórcio bacteriano seria aprofundar os conhecimentos sobre os meios de cultura utilizados para o crescimento bacteriano. Para além de se obterem maiores quantidades de biomassa e sobrenadante para fraccionar, seria possível obter uma maior variedade de microrganismos passíveis de serem fermentados. Uma vez que as esponjas apresentam uma grande riqueza microbiológica e no máximo apenas 5% das estirpes se conseguem fermentar nas condições laboratoriais comumente conhecidas, optimizando as condições de crescimento das bactérias marinhas, tentar-se-ia obter colónias das restantes estirpes (Kennedy, 2009).

Como se pôde verificar, os resultados obtidos do estudo dos extractos do consórcio bacteriano não foram os esperados. Desde o início do trabalho havia o conhecimento da pouca estabilidade destes compostos e sempre existiu o cuidado de os preservar nas condições mais apropriadas. Contudo, retirou-se informação preciosa que irá ser muito útil para o desenvolvimento de trabalho futuro.

### 3. Conclusão

---



Cada vez mais cientistas concluem que a Natureza pode providenciar as soluções para grande parte das questões humanas. Os oceanos, sendo um dos ecossistemas ainda menos explorados, permanecem com muitos dos seus segredos por revelar.

As esponjas marinhas são, sem dúvida, o filo do reino animal de onde provêm o maior número de histórias de sucesso na descoberta de novos compostos farmacológicos. É inevitável que, ao estudar-se as esponjas e os micro e macro organismos que partilham o seu “habitat”, exista a esperança de se encontrar um novo composto com qualidades químicas promissoras.

Neste trabalho isolou-se o composto maioritário de dois extractos de *n*-hexano (extracto externo e interno) obtidos de indivíduos da espécie *Hypselodoris fontandraui*, recolhidos ao largo das ilhas Berlengas. O fraccionamento e purificação dos extractos foram efectuados através de cromatografia em coluna aberta e HPLC. O composto isolado foi identificado como sendo o mesmo em ambos os extractos, obtendo-se 3,6mg/animal e um rendimento total de 37%. Por espectroscopia de RMN foi possível determinar a sua estrutura química e identificar este composto com sendo o furanosesquiterpeno tavacpalascensina. Este composto, conhecido como um metabolito secundário da esponja *Dysidea fragilis*, foi pela primeira vez isolado deste nudibrânquio neste trabalho.

A segunda parte deste trabalho focou-se em purificar os compostos existentes nas soluções de sobrenadante e biomassa resultantes da fermentação semi-piloto de uma estirpe bacteriana (P#1) isolada do interior da esponja *Phorbas* sp. recolhida no Outão, em Setúbal. Após operações de extracção, obtiveram-se os extractos de éter e de diclorometano provenientes da biomassa (66,31mg e 75,10mg respectivamente) e o extracto de éter proveniente do sobrenadante (225,1mg). Por utilização de técnicas cromatográficas conseguiram-se purificar algumas fracções destes extractos. Contudo, a identificação da estrutura química não foi alcançada para nenhum dos isolados. Tal poderá ser devido à fácil degradação destes compostos, ao tempo que por vezes decorria entre as actividades e o uso de solventes puros mas não destilados, que potenciaram ainda mais a deterioração da integridade dos compostos químicos.

Durante este trabalho, encontraram-se alguns obstáculos que se foram tentando ultrapassar e quando tal não foi possível, aprendeu-se algo de novo sobre estes organismos e os seus compostos. As informações obtidas neste estudo permitem retirar algumas conclusões preciosas de modo a desenvolver e refinar estratégias dirigidas para um isolamento bem sucedido de compostos sintetizados por estas bactérias. É imperativo não desistir... É necessário persistir!

## **4. Parte experimental**

---

#### **4.1. Material e métodos**

##### Solventes

Os solventes utilizados foram da Merck, Fluka Riedel-de Hën e da Fischer Scientific, de grau analítico. Em HPLC, os solventes utilizados foram específicos para esta técnica cromatográfica, Chromasolv da Sigma-Aldrich. Para as técnicas de RMN foram utilizados como solventes deuterados o clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ) e benzeno ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ) da Aldrich.

##### Centrífuga

Para a separação da biomassa do sobrenadante foi utilizada a centrífuga Beckman J2-21 M/E.

##### Evaporador rotativo

Este equipamento, Büchi Heating Bath B-490, foi utilizado para a evaporação dos solventes utilizados, sendo o banho mantido a 30°C.

##### Ultra-sons

Para a lise celular e para remoção do ar dos solventes a utilizar em HPLC, utilizaram-se, respectivamente os equipamentos Grant Ultrasonic Bath XB3 e Branson 3510.

##### Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética foram obtidos num espectrofotômetro Bruker Avance 400, operando a 400 MHz para  $^1\text{H}$  e a 100 MHz para  $^{13}\text{C}$  ou num espectrofotômetro Bruker DRX-600. Utilizou-se  $\text{CDCl}_3$  ou  $\text{C}_6\text{D}_6$  como solventes e os sinais foram registados tendo como referência interna o sinal residual do solvente. Os desvios químicos ( $\delta$ ) observados são dados em ppm enquanto que as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hz

#### Cromatografia em camada fina (c.c.f.)

As c.c.f. foram executadas em placas pré-preparadas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Ref<sup>a</sup> Merck 5554) e sílica gel 60 RP-18 F<sub>254S</sub> (Ref<sup>a</sup> Merck 5559) em suporte de alumínio, com 0,2 mm de espessura. Para revelação das placas utilizou-se irradiação com luz com comprimento de onda na região dos Ultra-Violeta ( $\lambda = 254\text{nm}$ ) e pulverização da superfície das placas com as soluções reveladoras, seguindo-se aquecimento a 100-120°C.

#### Cromatografia em camada fina preparativa

Esta cromatografia foi efectuada numa placa de c.c.f. de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Ref<sup>a</sup> Merck 5554), em suporte de alumínio, com 0,2 mm de espessura. A totalidade da amostra foi aplicada e os compostos desadsorvidos da fase estacionária com éter etílico. A revelação foi efectuada com luz UV e revelador de Ehrlich.

#### Cromatografia em coluna

Para esta cromatografia utilizou-se como fase estacionária sílica gel 60, 230-400 “mesh” (Ref<sup>a</sup> Merck 109385). Os eluentes a utilizar foram determinados por ensaios prévios em c.c.f. No final do método, faz-se passar pela coluna com um solvente de polaridade superior ao utilizado. O acompanhamento destas cromatografias foi efectuado por c.c.f., utilizando os respectivos eluentes.

#### Cromatografia em coluna de média pressão pré-empacotada

Utilizou-se uma coluna pré-empacotada (75mm de altura e 12 mm de diâmetro) de fase reversa, preenchida com sílica gel RP 18 “endcapped” (40-63  $\mu\text{m}$ ) (ref<sup>a</sup> Büchi 54860). Estas cromatografias decorreram sob pressão e foram utilizados solventes de polaridade decrescente. O acompanhamento destas cromatografias foi efectuado por c.c.f., utilizando os respectivos eluentes.

#### Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Os ensaios por esta técnica foram executados num cromatógrafo da Dionex, com o software Chromeleon vs 6.80 Dionex Corporation, equipado com uma bomba para solventes com 4 canais (P680) e um detector de UV Dionex UVD340U (os comprimentos de onda utilizados foram:  $\lambda = 210\text{nm}$ ;  $\lambda = 254\text{nm}$ ;  $\lambda = 280\text{nm}$  e  $\lambda = 350\text{nm}$ ). Com este equipamento foram utilizadas as colunas cromatográficas Luna

(150x4,6 nm) i) fase normal silica 3 $\mu$  (Ref<sup>a</sup> 00F-4162-E0 Phenomenex) e ii) fase reversa C18 100R 3 $\mu$  (Ref<sup>a</sup> 00F-4251-E0-BV Phenomenex) ou LiChroCART 250-4 Purospher Star RP-18 endcapped (5  $\mu$ m) (Ref<sup>a</sup> 150252 Merck).

#### Reveladores

As placas cromatográficas foram visualizadas à luz Ultra-Violeta ( $\lambda_{254\text{nm}}$ ) e posteriormente pulverizadas com as soluções de Ce(SO<sub>4</sub>), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou revelador de Ehrlich, seguidas por aquecimento a cerca de 100°C. As composições destes reveladores encontram-se no capítulo 6.3.

## **4.2. Estudo do metabolito secundário do *Hypselodoris fontandraui***

### **4.2.1. Recolha do material biológico**

Os espécimes estudados foram recolhidos por mergulho efectuado durante o mês de Outubro de 2007, na costa Oeste portuguesa, ao largo das ilhas Berlengas, a uma profundidade de 8-10 m. As amostras foram congeladas de imediato após a recolha e conservadas a -20°C até à sua análise.

### **4.2.2. Obtenção dos extractos do *H. fontandraui***

Três espécimes destes invertebrados foram descongelados dos -20°C em que se encontravam, foram submersos em 20 mL de acetona e sujeitos a ultras-sons durante 2 minutos. Filtrou-se e repetiu-se a operação três vezes utilizando o mesmo volume de acetona. Esta foi removida sob vácuo tendo-se obtido um resíduo não totalmente seco. Este resíduo foi introduzido numa coluna utilizando sulfato de magnésio anidro como adsorvente e éter como eluente. Evaporou-se o solvente numa câmara hipobárica e obteve-se um óleo sem cor que se designou por extracto exterior.

Após estas operações, os três espécimes foram desintegrados com um pilão e efectuaram-se os mesmos passos para a recolha dos compostos químicos do interior do organismo, obtendo-se o que se designou por extracto interior.

### **4.2.3. Isolamento dos metabolitos secundários do *H. fontandraui***

Para averiguação dos compostos existentes nos extractos obtidos, efectuou-se c.c.f. de fase normal, utilizando *n*-hexano como eluente e revelando com revelador de Ehrlich.

Os extractos interno e externo foram fraccionados por cromatografia em coluna aberta, utilizando as condições descritas na tabela 4. As fracções recolhidas foram reunidas de acordo com o seu perfil cromatográficos. Os resultados obtidos encontram-se compilados na tabela 5 (extracto exterior) e 6 (extracto interior).

Tabela 4: Condições de eluição da coluna cromatográfica para separação dos compostos dos extractos interior e exterior do *H. fontandraui*.

<i>Massa da amostra</i>	extracto exterior: 17,1mg extracto interior: 11,4mg
<i>Diâmetro</i>	0,5 cm
<i>Altura</i>	10 cm
<i>Enchimento</i>	Sílica gel 60
<i>Volume das fracções</i>	1 mL
<i>Eluente</i>	<i>n</i> -hexano
<i>Eluição final</i>	éter etílico/ volume indeterminado
<i>Sem pressão</i>	

Tabela 5: Massas e rendimentos obtidos das fracções provenientes da cromatografia do extracto exterior com *n*-hexano

<i>Fracção</i>	E5	E[6-7]	S[8-9]	E[10-13]	E[14-15]	E[16-19]	E20	E[21-23]	E[24-47]	E48
<i>Eluente</i>	hex	hex	Hex	hex	hex	hex	hex	hex	hex	é.e.
<i>Massa (mg)</i>	0,3	0,1	0,1	0,2	0,1	0,5	0,2	0,3	7,6	5,5
<i>η (%)</i>	1,8	0,6	0,6	1,2	0,6	2,9	1,2	1,8	45	33

Tabela 6: Massas e rendimentos obtidos das fracções provenientes da cromatografia do extracto interior com *n*-hexano

<i>Fracção</i>	I[4-5]	I6	I[7-10]	I11	I[12-15]	I[16-17]	I[18-19]	I20	I[21-43]	I44
<i>Eluente</i>	hex	hex	Hex	hex	hex	hex	hex	hex	hex	é.e.
<i>Massa (mg)</i>	0,1	0,8	0,7	0,9	0,2	0,2	0,7	0,3	3,1	3,6
<i>η (%)</i>	0,9	7,3	6,4	8,2	1,8	1,8	6,4	2,7	28	21

Todas as fracções foram analisadas por HPLC nas seguintes condições de trabalho:



Tabela 7: Condições de operação para purificação das fracções isoladas dos extractos do  
*H. fontandraui*

<i>Concentração da amostra</i>	1 mg/mL (em <i>n</i> -hexano)
<i>Coluna de fase normal</i>	
<i>Volume da injeção</i>	20 $\mu$ L
<i>Eluente</i>	<i>n</i> -hexano
<i>Fluxo</i>	0,75 mL/min
<i>Programa de gradiente</i>	(%) <i>n</i> -hexano
	0 min 100
	20 min 100

A fracção E[24-47] foi posteriormente analisada por RMN (Bruker Avance 400), efectuando-se espectros de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT135,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMBC e HMQC.

***Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fracção E[24-47] (400 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ )  $\delta$  ppm (figura 14, capítulo 2):*** 7,03d ( $J=2$  Hz); 6,88d ( $J=7,6$  Hz); 6,80d ( $J=7,6$  Hz); 5,94d ( $J=1,2$  Hz); 3,92d ( $J=12,40$  Hz); 2,77quart ( $J=6,0$  Hz;  $J=2,4$  Hz;  $J=3,6$  Hz); 2,74quint ( $J=1,6$  Hz;  $J=4,4$  Hz;  $J=4,4$  Hz;  $J=1,60$  Hz); 2,12s; 2,09s.

***Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da fracção E[24-47] (100 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ )  $\delta$  ppm (figura 15, capítulo 2):*** 148,6; 139,5; 139,4; 138,3; 133,3; 132,2; 128,6; 128,3; 117,9; 112,6; 28,1; 27,5; 24,4; 20,4; 20,2.

Os resultados do espectro DEPT 135 e dos espectros de correlação HMQC e HMBC encontram-se descritos e discutidos no capítulo 2.

### **4.3. Estudo químico do consórcio bacteriano obtido a partir da esponja *Phorbas* sp.**

#### **4.3.1. Recolha da esponja e crescimento do consórcio bacteriano**

As esponjas foram recolhidas por mergulho efectuado em Abril de 2006 na zona do Outão, na Arrábida, Setúbal, a uma profundidade de 10 m e conservados em água do mar estéril. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar e em condições de assepsia, as células superficiais do interior e do exterior da esponja foram recolhidas e suspensas em meio de cultura bacteriano para promover o seu crescimento.

#### **4.3.2. Obtenção dos extractos bacterianos**

No estudo de Faneca (2007) foram efectuados os passos necessários para se alcançar a estirpe que se irá estudar neste trabalho.

As bactérias retiradas da esponja *Phorbas* sp., como indicado no ponto anterior, foram crescidas em meio de cultura líquido e foram efectuados os crescimentos necessários até se obter uma estirpe pura. Obteve-se uma colónia pura de uma estirpe isolada do interior da esponja *Phorbas* sp., Gram negativa, denominada #P1. Esta estirpe foi sujeita a fermentação à escala semi-piloto resultando cerca de 10L de solução bacteriana; após filtração tangencial, obtiveram-se 800mL de solução de biomassa e 2750mL de sobrenadante. Foram estas duas soluções obtidas da fermentação da estirpe #P1 que foram objecto de estudo deste trabalho.

#### **4.3.3. Isolamento dos metabolitos secundários do consórcio bacteriano**

##### **4.3.3.1. Extracto da biomassa**

O volume de suspensão de biomassa proveniente da fermentação (800 mL) foi centrifugado durante 10 minutos a 8000 rpm. À biomassa recuperada destrui-se a parede celular, adicionando acetona (1:1 v/v), submetendo a ultra-sons durante 10 minutos e centrifugando (8000 rpm durante 10 minutos). Esta operação foi repetida três vezes e a última centrifugação ocorreu a 10000 rpm, durante 15 minutos.

A acetona foi evaporada no evaporador rotativo, com o banho à temperatura de 30°C, resultando deste modo uma solução aquosa com os compostos produzidos intra-

celularmente pelas células bacterianas. Esta solução foi submetida a uma extracção líquido-líquido, utilizando o mesmo volume de éter etílico, em três vezes. A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio, filtrada e evaporada até à secura. Da evaporação obteve-se 66,31mg de um óleo de cor acastanhada (*extracto de éter B/EE*).

A fase aquosa obtida da extracção líquido-líquido foi novamente extraída, desta vez com o diclorometano 1:1 v/v repartido por três vezes. Todos os passos foram repetidos, obtendo-se 75,1mg de um óleo acastanhado (*extracto de diclorometano B/D*).

Efectuaram-se c.c.f. de fase normal utilizando vários gradientes de *n*-hexano/éter etílico.

Efectuou-se uma c.c.f. de fase normal do meio de cultura do crescimento bacteriano, tal como indicado em Faneca (2007), utilizando como eluente AcOEt:MeOH 8:2 e revelando com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e aquecimento.

#### 4.3.3.1.1. *Extracto de diclorometano*

Este extracto foi sujeito a cromatografia em coluna “flash” preenchida com sílica gel 60 (cc A) sob pressão. Utilizou-se como eluente o correspondente a um R<sub>f</sub> de 0,33 em c.c.f. As condições de trabalho desta cromatografia encontram-se reunidas na tabela 8.

Tabela 8: Condições de trabalho da cromatografia em coluna A sob pressão

<i>Massa inicial da amostra:</i>	75,10mg
<i>Diâmetro da coluna:</i>	1 cm
<i>Altura da coluna:</i>	15 cm
<i>Fluxo de eluente:</i>	5 mL/min
<i>Volume das fracções:</i>	5 mL
<i>Volume da fracção A44:</i>	> 5mL
<i>Eluente:</i>	<i>n</i> -hexano:éter etílico 3:7

Foram recolhidas 44 fracções, que foram reunidas de acordo com o seu perfil cromatográfico. Os resultados mais relevantes encontram-se compilados na tabela 9.

Observou-se por c.c.f. que a fracção A[2-19] continha o produto que se pretendia isolar.

Tabela 9: Resultados da cc A do extracto B/D

<i>Fracções</i>	<i>A[2-19]</i>	<i>A[38-43]</i>	<i>A44</i>
<i>Eluente</i>	hex :é.e. 3:7	hex :é.e. 3:7	MeOH
<i>Massa (mg)</i>	31,04	2,400	13,38
<i>η (%)</i>	44,7	3,4	18,8

Analizou-se a amostra *A44* por HPLC (figura 29, capítulo 6) e as condições de trabalho foram as descritas na tabela 10.

Tabela 10: Condições de eluição da cromatografia HPLC da amostra *A44*

<i>Concentração da amostra</i>	1 mg/mL (MeOH)	
<i>Coluna de fase reversa</i>		
<i>Volume da injeção</i>	10 μL	
<i>Eluentes</i>	MeOH/ H <sub>2</sub> O	
<i>Fluxo</i>	1 mL/min	
<i>Programa de gradiente</i>		
	(%) MeOH	(%) H <sub>2</sub> O
0 min	50	50
10 min	100	0
20 min	100	0
25 min	50	50

#### 4.3.3.1.2. Extracto de éter

Os compostos existentes neste extracto foram separados por cromatografia em coluna preenchida com sílica gel 60 (cc B), sob pressão, nas condições indicadas na tabela 11.

Tabela 11: Condições de trabalho da cc B para análise do extracto B/EE

<i>Massa inicial da amostra:</i>	66,31mg
<i>Diâmetro da coluna:</i>	1 cm
<i>Altura da coluna:</i>	15 cm
<i>Fluxo de eluente:</i>	6,4 cm/min
<i>Volume das fracções:</i>	5 mL
<i>Volume da fracção B37</i>	> 5mL
<i>Eluentes:</i>	<i>n</i> -hexano: éter etílico 1:1 /1:9

No final da cromatografia, o leito da coluna foi eluído com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH 1:1 e de seguida com MeOH, tendo estas fracções sido recolhidas conjuntamente e denominadas B37. As fracções recolhidas foram reunidas de acordo com o seu perfil cromatográfico e encontram-se resumidas na tabela 12.

Tabela 12: Tabela resumo das fracções e correspondentes massas obtidas da cc B do extracto B/EE.

<i>Fracções</i>	B[1-3]	B[5-7]	B[8-10]	B11	B[12-13]	B14	<i>B[15-17]</i>	B18	B[19-21]	B[22-36]	B37
<i>Eluente</i>	hex:e.e. 1:1	hex:e.e. 1:1	hex:e.e. 1:1	hex:e.e. 1:1	hex:e.e. 1:1	hex:e.e. 1:1	hex:e.e. 1:1	hex:e.e. 1:1	hex:e.e. 1:1/ 1:9 *	hex:e.e. 1:9	**
<i>Massa (mg)</i>	12,03	3,470	3,640	0,760	2,080	1,130	<i>2,650</i>	1,000	2,630	9,190	17,82
<i>η (%)</i>	18,1	5,2	5,5	1,1	3,1	1,7	<i>4,0</i>	1,5	4,0	13,9	26,9

\* Até à fracção nº20, a recolha foi feita com hex:e.e. 1:1

\*\* CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 1:1 e MeOH

Analizou-se a fracção B[15-17] por HPLC equipado com uma coluna de fase normal nas condições de trabalho indicadas na tabela 13. O cromatograma obtido encontra-se na figura 30, capítulo 6.

Tabela 13: Condições de eluição da fracção B[15-17] em HPLC

<i>Concentração da amostra</i>	1 mg/mL (n-hexano)	
<i>Coluna de fase normal</i>		
<i>Volume da injeção</i>	20µL	
<i>Eluentes</i>	n-hexano / 2-propanol	
<i>Fluxo</i>	0,75 mL / min	
<i>Programa de gradiente</i>		
	(%) n-hexano	(%) 2-propanol
0 min	99	1
40 min	99	1

#### 4.3.3.2. Extracto do sobrenadante

Obteve-se o extracto do sobrenadante (2750mL) através de extracção líquido-líquido com éter etílico, de igual volume (~3x900mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada até à secura no evaporador rotativo, obtendo-se 225,1mg de um óleo acastanhado que constitui o extracto de éter *S/EE*.

Através de cromatografia em coluna de média pressão pré-empacotada de fase reversa cc C (condições de trabalho indicadas na tabela 14) efectuou-se a separação dos compostos deste extracto. Introduziu-se 70mg do extracto de éter S/EE na coluna, mas por precipitação da amostra, apenas foram processadas 47,2mg.

Tabela 14: Condições de trabalho da cc C para análise do extracto S/EE

<i>Massa inicial da amostra:</i>	47,2mg
<i>Fluxo de eluente:</i>	2,5 mL/min
<i>Volume das fracções:</i>	2 mL
<i>Volume das fracções C81 e C82</i>	> 2mL
<i>Eluentes:</i>	H <sub>2</sub> O:MeOH 7:3 / 1:1 / 3:7

As fracções recolhidas foram reunidas de acordo com o seu perfil cromatográfico e encontram-se resumidas na tabela 15.

Tabela 15. Massas das fracções recolhidas e respectivos eluentes utilizados na cc C

<i>Fracções</i>	<i>C[2-6]</i>	<i>C[7-38]</i>	<i>C[39-48]</i>	<i>C[49-54]</i>	<i>C[55-80]</i>	<i>C81</i>	<i>C82</i>
<i>Eluente</i>	H <sub>2</sub> O:MeOH 7:3	H <sub>2</sub> O:MeOH 7:3	H <sub>2</sub> O:MeOH 1:1	H <sub>2</sub> O:MeOH 1:1	H <sub>2</sub> O:MeOH 1:1	H <sub>2</sub> O:MeOH 3:7	MeOH
<i>Massa (mg)</i>	1,2	2,8	0,8	1,3	0,4	9,8	18,1
<i>η (%)</i>	2,5	5,9	1,7	2,8	0,8	20,8	38,3

Os 22,8mg da amostra não solúvel no eluente da coluna anterior foram re-dissolvidos em MeOH e efectuou-se uma cromatografia em camada fina preparativa utilizando uma placa de c.c.f. de fase reversa. Como eluente utilizou-se H<sub>2</sub>O/MeOH 3:7 revelou-se com luz UV, revelador de Ehrlich e aquecimento. Os resultados da coluna preparativa encontram-se resumidos na tabela 16.

Tabela 16:  $R_f$  das manchas e massas dos compostos isolados por c.c.f. preparativa

<i>Fracções</i>	<i>Prep1</i>	<i>Prep2</i>	<i>Prep3</i>	<i>Prep4</i>	<i>Prep5</i>	<i>Prep6</i>
$R_f$	0,81	0,72	0,55	0,51	0,39	0,32
<i>Revelador</i>	UV	UV	Ehrlich	UV	Ehrlich	UV
<i>Massa (mg)</i>	0,3	0,4	0,4	0,3	0,5	0,4
$\eta$ (%)	1,3	1,8	1,8	1,3	2,2	1,8

Para analisar a restante amostra do extracto inicial S/EE (155,1 mg) procedeu-se a uma nova cromatografia em coluna de média pré-empacotada de fase reversa (cc D), utilizando uma gama mais variada de polaridades de eluentes, sendo recolhidas 12 fracções de cada eluente utilizado. Para garantir o isolamento do composto mais polar, as primeiras três fracções foram recolhidas com o fluxo a 2,5 mL/min e ajustado para 5 mL/min para as restantes recolhas. A amostra foi dissolvida em 1 mL de H<sub>2</sub>O/MeOH 7:3 adicionando primeiro o metanol para evitar a precipitação da amostra. A cromatografia processou-se nas condições descritas na tabela 17.

Tabela 17: Condições de trabalho da cc D para análise do extracto S/EE

<i>Massa inicial da amostra:</i>	155,1mg
<i>Especificações da coluna fornecidas pelo fabricante</i>	
<i>Fluxo inicial de eluente:</i>	2,5mL/min
<i>Fluxo de eluente:</i>	5 mL/min
<i>Volume das fracções:</i>	10mL
<i>Volume das fracções D27</i>	> 10mL
<i>Eluentes:</i>	H <sub>2</sub> O:MeOH
	1:9 / 2:8 / 3:7 / 4:6 / 1:1 / 6:4 / 7:3

As fracções recolhidas foram reunidas de acordo com o seu perfil cromatográfico e encontram-se resumidas na tabela 18.

A amostra D26 foi sujeita a HPLC equipada com coluna de fase reversa trabalhando nas condições indicadas na tabela 19.

Tabela 18: Massas das fracções recolhidas e respectivos eluentes utilizados na cc D

<i>Fracção</i>	<i>Eluente</i>	<i>Massa (mg)</i>	<i>η (%)</i>
D1	H <sub>2</sub> O/MeOH 1:9	6,2	4,0
D2	H <sub>2</sub> O/MeOH 1:9	35,5	22,9
D3	H <sub>2</sub> O/MeOH 1:9	4,9	3,2
D4	H <sub>2</sub> O/MeOH 1:9	0,7	0,5
D5	H <sub>2</sub> O/MeOH 2:8	7,8	5,0
D6	H <sub>2</sub> O/MeOH 2:8	2,4	1,5
D7	H <sub>2</sub> O/MeOH 2:8	2,5	1,6
D8	H <sub>2</sub> O/MeOH 2:8	6,9	4,4
D9	H <sub>2</sub> O/MeOH 3:7	6,7	4,3
D10	H <sub>2</sub> O/MeOH 3:7	2,9	1,9
D11	H <sub>2</sub> O/MeOH 3:7	6,6	4,3
D12	H <sub>2</sub> O/MeOH 3:7	9,8	6,3
D13	H <sub>2</sub> O/MeOH 4:6	3,0	1,9
D14	H <sub>2</sub> O/MeOH 4:6	2,2	1,4
D15	H <sub>2</sub> O/MeOH 4:6	1,1	0,7
D16	H <sub>2</sub> O/MeOH 4:6	1,7	1,1
D17	H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1	1,5	1,0
D18	H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1	1,7	1,1
D19	H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1	1,8	1,2
D20	H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1	0,5	0,3
D21	H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1	3,0	1,9
D22	H <sub>2</sub> O/MeOH 6:4	3,6	2,3
D23	H <sub>2</sub> O/MeOH 6:4	3,7	2,4
D24	H <sub>2</sub> O/MeOH 6:4	6,1	3,9
D25	H <sub>2</sub> O/MeOH 7:3	3,2	2,1
D26	H <sub>2</sub> O/MeOH 7:3	9,3	6,0
D27	MeOH 100%	7,8	5,0



Tabela 19: Condições de trabalho da cromatografia HPLC da amostra D26

<i>Concentração da amostra</i>	0,9 mg/mL ( H <sub>2</sub> O: MeOH 9:1)																						
<i>Coluna de fase reversa</i>																							
<i>Volume da injeção</i>	100 $\mu$ L																						
<i>Eluentes</i>	H <sub>2</sub> O/ MeOH																						
<i>Fluxo</i>	0,75 mL / min																						
<i>Comprimentos de onda do detector</i>	$\lambda$ = 210/257/280/350 nm																						
<i>Programa de gradiente</i>	<table> <tr> <th></th><th>(%)H<sub>2</sub>O</th><th>(%)MeOH</th></tr> <tr> <td>0 min</td><td>55</td><td>45</td></tr> <tr> <td>5 min</td><td>55</td><td>45</td></tr> <tr> <td>10 min</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr> <td>30 min</td><td>100</td><td>100</td></tr> <tr> <td>31 min</td><td>55</td><td>45</td></tr> <tr> <td>41 min</td><td>45</td><td>45</td></tr> </table>			(%)H <sub>2</sub> O	(%)MeOH	0 min	55	45	5 min	55	45	10 min	0	100	30 min	100	100	31 min	55	45	41 min	45	45
	(%)H <sub>2</sub> O	(%)MeOH																					
0 min	55	45																					
5 min	55	45																					
10 min	0	100																					
30 min	100	100																					
31 min	55	45																					
41 min	45	45																					

Desta amostra foram isolados oito compostos correspondentes aos oito picos observados na figura 31 (capítulo 6) e cujas massas se apresentam na tabela 20.

Tabela 20: Tempos de retenção ( $t_R$ ) e massas dos compostos isolados por HPLC da fração D26

	$DP_1$	$DP_2$	$DP_3$	$DP_4$	$DP_{5D}$	$DP_6$	$DP_7$	$DP_8$
$t_R$ (min)	2,6	3,0	5,9	6,2	6,5	7,1	8,0	8,9
massa (mg)	0,2	0,2	0,2	0,1	0,5	0,7	0,6	0,4
$\eta$ (%)	2,2	2,2	2,2	1,1	5,4	7,5	6,5	4,3

Os compostos isolados da amostra D26 foram analisados por espectroscopia de RMN, realizando RMN  $^1H$  com frequência de 600MHz (ICB).

## **5. Bibliografia**

---

- Amarego, W., & Chai, C. (1992) *Purification of laboratory chemicals*. Oxford: Pergamon Press.
- Anand, T., Bhat, A., Shouche, Y., Roy, U., Siddharth, J., Sarma, S. (2006). Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from waters of the coast of South east India. *Microbiological Research*, 161, 252-262.
- Avila, C., Cimino, G., Fontana, A., Gavagnin, M., Ortea, J. & Trivellone, E. (1991). Defensive strategy of two *Hypselodoris* Nudibranchs from italian and spanish coasts. *Journal of Chemical Ecology*, 17(3), 625-636.
- Bailly, C. (2009) Ready for a comeback of natural products in oncology. *Biochemical Pharmacology*, 77, 1447-1457.
- Bergmann, W., & Feeney, R. J. (1950). The isolation of a new thymine pentoside from sponges. *Journal of the American Chemical Society*, 72, 2809-2810.
- Bergman W., & Feeney, R. J. (1951) Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. *J. Org. Chem.*, 16, 981-987.
- Bhakuni, D. S., Rawat, D. S. (2005) Bioactive Metabolites of Marine Invertebrates. In D.S. Bhakuni, D. S. Rawat, *Bioactive Marine Natural Products* (pp.26-63). New Dehli, India: Anamaya Pub.
- Blat, S. V., Nagasampagi, B. A., & Sivakumer, M. (2006) *Chemistry of natural products*. New Dehli: Narosa Pub.
- Blunt, J., Copp, B., Hu, W.-P., Munro, M., Northcote, P., & Prinsep, M. (2009) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 26, 170–244.
- Blunt, J., Copp, B., Hu, W.-P., Munro, M., Northcote, P., & Prinsep, M. (2007) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 24(31), 35–94.
- Bolliger, H. R., Brenner, M., Gänshirt, H., Mangold, H. K., Seiler, H., Stahl, E., Waldi, D. (1965) *Thin-layer Chromatography: A laboratory handbook*. Academic press Inc (NY).
- Butler, M. (2004) The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *Journal of Natural Product*, 67(12), 2141-2153.
- Butler, M. (2005) Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Natural Product Reports*, 22, 162-195.
- Campbell, I., Dwek, R. (1984). *Biological spectroscopy* (pp. 37-60). Benjamin/Cummings Pub, California, USA.

- Cannell, R. (1998) How to approach the isolation of a natural product. In R. Cannell, *Methods in Biotechnology, Vol. 4, Natural Products Isolation* (pp. 1-51). Humana Press Inc. Totowa, NJ.
- Cannell, R. (1998) Follow-Up of Natural Product Isolation. In R. Cannell, *Methods in Biotechnology, Vol. 4, Natural Products Isolation* (pp. 425-463). Humana Press Inc. Totowa, NJ.
- Carballo, J. L., Zubía, E., & Ortega, M. J. (2006) Biological and chemical characterizations of three new species of Dysidea (Porifera: Demospongiae) from the Pacific Mexican coast. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34, 498-508.
- Chin, Y.-W., Balunas, M., Chai, H., & Kinghorn, A. (2006) Drug discovery from natural sources. *The AAPS Journal*, 8(2), 239-253.
- Cimino, G. (1977). A survey of sesquiterpenoids from marine sponges. In J. Faulkner & W. H. Fenical (Ed) *Marine natural products chemistry* (pp.61-70). NY: Plenum Press.
- Cimino, G., De Rosa, S., De Stefano, S., & Sodano, G. (1982). The chemical defense of four mediterranean nudibranchs. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 73B(3), 471-474.
- Cimino, G., Fontana, A., Giménez, F., Marin, A., Mollo, E., Trivellone, E. & Zubia, E. (1993). Biotransformation of a dietary sesterterpenoid in the Mediterranean nudibranch *Hypselodoris orsini*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 49(6-7/July), 582-586.
- Clardy, J. (2005). Using genomics to deliver natural products from symbiotic bacteria. *Genome Biology*, 6(9), 232.1-232.4.
- Coates, J. (2000) Interpretation of Infrared Spectra. A Practical Approach. In R. A Meyers, *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (pp.10815-10837). John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Colthrup, N.B., Daly, L.H. & Wiberley, S.E. (1990) *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy* (pp. 1–73). Academic Press: San Diego, CA.
- Connon, S., & Giovannoni, S. (2002) High-Throughput Methods for Culturing Microorganisms in Very-Low-Nutrient Media Yield Diverse New Marine Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, August, 3878–3885.
- Cordell, G. (2009) Biodiversity and drug discovery: A symbiotic relationship. *Phytochemistry*, 55, 463-480.

- Corre, C., & Challis, G. (2009). New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining. *Nat. Prod. Rep.*, 26, 977–986.
- Costa-Lotufo, L., Wilke, D. & Jimenez, P. (2009) Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico e perspectivas. *Química nova*, 32(3), 703-716.
- Cragg, G., & Newman, D. (2001) Natural Product Drug Discovery in the Next Millennium. *Pharmaceutical Biology*, 39(Supplement), 8–17.
- De Rosa, S., Mitova, M., & Tommonaro, G. (2003). Marine bacteria associated with sponge as a source of cyclic peptides. *Biomolecular Engineering*, 20, 311-316.
- Faulkner, D. J. (2001). Marine natural products. *Natural Products Reports*, 18, 1-49.
- Faneca, L. (2007) *Consórcios marinhos – uma abordagem química*. Relatório do Projecto da Licenciatura em Química, DQB, FCUL. (Documento não publicado)
- Fraga, B. (2002) Natural sesquiterpenoids. *Nat. Prod. Rep.*, 17, 483–504.
- Fontana, A., Avila, C., Martinez, E., Ortea, J., Trivellone, E., & Cimino, G. (1993) Defensive allomones in three species of *Hypselodoris* (Gastropode: Nudibranchia) from the Cantabrian sea. *Journal of Chemical Ecology*, 19(2), 339-356.
- Fontana, A., Trivellone, E., Mollo, E., Cimino, G., Avila, C., Martinez, E., & Ortea, J. (1994) Further chemical studies of Mediterranean and Atlantic *Hypselodoris* Nudibranchs: A new furanosesquiterpenoids from *Hypselodoris webbi*. *Journal of Natural products*, 57(4), 510-513.
- Füllbeck, M., Michalsky, E., Dunkel, M., & Preissner, R. (2006) Natural products: Sources and databases. *Natural Products Reports*, 23, 347-356.
- García-Gómez, J. C., Cimino, G., & Medina, A. (1990). Studies on the defensive behaviour of *Hypselodoris* species (Gastropode: Nudibranchia): ultrastructure and chemical analysis of mantle dermal formations (MDFs). *Marine Biology*, 100, 245-250.
- Gaspar, H., Gavagnin, M., Calado, G., Castelluccio, F., Mollo, E., & Cimino, G. (2005). Pelseneeriol-1 and -2: new furanosesquiterpene alcohols from porostome nudibranch *Doriopsilla pelseneeri*. *Tetrahedron*, 61, 11032-11037.
- Gaspar, H., Rodrigues, A. S., Santos, S., Rodrigues, A. I., Humanes, M., Calado, G., & Gavagnin, M. (no prelo). Furanosesquiterpenos from marine sponge *Cacospongia scalaris* and from the nudibranch *Hypselodoris fontandraui*.
- Gaspar, H., Santos, S., Carbone, M., Rodrigues, A. S., Rodrigues, A. I., Uriz, M. J., Feio, S., Melck, D., Humanes, M., & Gavagnin, M. (2008) Isomeric

- furanosesquiterpenos from Portuguese marine sponge *Fasciospongia sp.*, *Journal of Natural Products*, 71(12), 2049-2052.
- Gavagnin, M., Mollo, E., Calado, G., Fahey, S., Ghiselin, M., Ortea, J. & Cimino, G. (2001) Chemical studies of porostome nudibranchs: Comparative and ecological aspects. *Chemoecology*, 11, 131-136.
- Gavagnin, M., Mollo, E., Castelluccio, F., Ghiselin, M., Calado, G., & Cimino, G. (2001) Can molluscs biosynthesize typical sponge metabolites? The case of the nudibranch *Doriopsilla areolata*. *Tetrahedron*, 57, 8913-8916.
- Grode, S., & Cardellina, J. (1984) Sesquiterpenes from the sponge *Dysidea etheria* and the nudibranch *Hypselodoris zebra*. *Journal of Natural Products*, 47(1), 76-83.
- Guella, G., Mancini, I., Guerriero, A., & Pietra, F. (1985) New Furano-sesquiterpenoids from Mediterranean Sponges. *Helvetica Chimica Acta*, 68(5), 1276 – 1282.
- Gullo, V., McAlpine, J., & Lam, K. (2006) Drug discovery from natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 534-531.
- Haber, M., Cerfeda, S., Carbone, M., Calado, G., Gaspar, H., Neves, R., Maharajan, V., Cimino, G., Gavagnin, M., Ghiselin, M., & Mollo, E. (no prelo) Distinguishing müllerian from bacteria mimics: a chemoeological study of the marine gastropod *Hypselodoris fontandraui*.
- Haygood, M., Schmidt, E., Davidson, S., & Falkner, D. (1999). Microbial symbionts of marine invertebrates: Opportunities for microbial biotechnology. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1(1), 33-43.
- Hildebrand, M., Waggoner, L., Lim, G., Sharp, K., & Ridley, C. (2004). Approches to identify, clone and express symbiont bioactive metabolite genes. *Natural Products Reports*, 21, 122-142.
- Hill, R. (2005) Marine natural products. *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. B*, 101, 124–136.
- Hill, R. (2006) Marine natural products. *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. B*, 102, 123–137.
- Ho, T.-L., & Lin, Y.-J. (1999). Synthesis of tavacpallascensin and occidol via a common intermediate. *Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1207-1210.
- Hochlowski, J., Walker, R., Ireland, C., & Faulkner, D. (1982) Metabolites of four Nudibranchs of the Genus *Hypselodoris*. *J. Org. Chem.*, 47, 88-91.

- Hunt, B., & Vincent, A. (2006). Scale and sustainability of marine bioprospecting for pharmaceuticals. *Ambio*, 35(2), 57-64.
- Ianora, A., Boersma, M., Gasotti, R., Fontana, A., Harder, J., Hoffmann, F., Pavia, H., Potin, P., Poulet, S. A., & Toth, G. (2006) The H.T. Odum Synthesis essay: New trends in Marine Chemical Ecology. *Estuaries and coasts*, 29(4), 531-551.
- Ikan, R. (1991) *Natural products – A laboratory guide* (2<sup>nd</sup> ed.). London: Academic Press Inc.
- Imhoff, J. (2004) New natural products from marine microorganisms. In A. Villwock (Ed.) *IFM – Geomar report 2002-2004* (pp. 44-46). Leibniz Institute of Marine Sciences (Kiel, Germany)
- Judd, T. (1998) The Sequestering of Secondary Compounds from Sponges by Nudibranchs. Colorado State University  
[http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/courses/en570/papers\\_1998/judd.html](http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/courses/en570/papers_1998/judd.html)
- Kaeberlein, T., Lewis, K. & Epstein, S. S. (2002) Isolating 'Uncultivable' Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment. *Science*, 296(5570), 1127-1130.
- Karuso, P., & Scheuer, P. J. (2002). Natural products from three Nudibranchs: *Nembrotha kubaryana*, *Hypselodoris infucata* and *Chromodoris petechialis*. *Molecules*, 7, 1-6.
- Kelecom, A. (2002). Secondary metabolites from marine microorganisms. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 74(1), 151–170.
- Kennedy, J., Baker, P., Piper, C., Cotter, P., Walsh, M., Mooij, M., Bourke, M., Rea, M., O'Connor, P., Ross, R., Hill, C., O'Gara, F., Marchesi, J., & Dobson, A. (2009) Isolation and analysis of bacteria with antimicrobial activities from marine sponge *Haliclona simulans* collected from Irish waters. *Marine Biotechnology*, 11, 384-396.
- Kobayashi, J., & Ishibashi, M. (1993) Bioactive Metabolites of Symbiotic Marine Microorganisms. *Chemical Reviews*, 93, 1753-1769.
- Koehn, F., & Carter, G. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature*, 4(March), 206-220.
- Koehn, F. (2008) High impact technologies for natural products screening. *Progress on Dutch research*, 65, 177-210.

- Ksebati, M., & Schmidt, F. (1988) Sesquiterpene furans and thiosesquiterpenes from the nudibranch *Ceratosoma brevicaudatum*. *Journal of Natural Products*, 51(5), 857-861.
- Li, Z. (2009) Advances in marine microbial symbionts in the China Sea and related pharmaceutical metabolites. *Marine Drugs*, 7, 113-129.
- Lindon, J. C., Trnater, G., Holmes, J. L. (2000) *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry*. Academic press, London, UK.
- Lopanik, N., Lindquist, N., & Targen, N. (2004) Potent cytotoxins produced by microbial symbiont protect host larvae from predation. *Oecologia*, 139, 131-139.
- Luesch, H., Yoshida, W., Moore, R., Paul, V., & Mooberry, S. (2000) Isolation, structure determination and biological activity of Lyngbyallin A from marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Journal of Natural Products*, 63(5), 611-615.
- Maier, M. (2009) Structural revisions of natural products by total synthesis. *Natural Product Reports*, 26, 1105-1124.
- Marris, E. (2006). Drugs from the deep, *Nature*, 443(26 October), 904-905.
- Mayer, A., Rodríguez, A., Berlinck, R., & Hamann, M. (2007) Marine pharmacology in 2003–4: Marine compounds with anthelmintic antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 145, 553–581.
- McNally, M. & Capon, R. (2001) Phorbacin B and C: Novel diterpenes from a southern Australian marine sponge, *Phorbac species*. *Journal of Natural Products*, 64(5), 645-647.
- McPhail, K., Davies-Coleman, M., & Coetzee, P. (1998) New furanosesterterpenene from the South African Nudibrach *Hypselodoris capensis* and a Dictyoceratida sponge. *Journal of Natural Products*, 61, 961-964.
- Moore, B. S. (2006) Biosynthesis of marine natural products: macroorganisms (Part B). *Nat. Prod. Rep.*, 23, 615–629.
- Murata, M., & Yasumoto, T. (2000) The structure elucidation and biological activities of high molecular weight algal toxins: maitotoxin, prymnesins and zooxanthellatoxins. *Nat. Prod. Rep.*, 17, 293-314.



- Newman, D., Cragg, G., & Snader, K. (2003). Natural products as a source of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66, 1022-1037.
- Nicolaou, K., Chen, J., & Dalby, S. (2009) From nature to the laboratory and into the clinic. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 2290-2303.
- Osinga, R., Armstrong, E., Burgess, J., Hoffmann, F., Reitner, J., & Schumann-Kindel, G. (2001) Sponge–microbe associations and their importance for sponge bioprocess engineering. *Hydrobiologia*, 461, 55–62.
- Osinga, R., Tramper, J., & Wijffles, R. H. (1999) Cultivation of marine sponges. *Marine Biotechnology*, 1, 509-532.
- Osinga, R., Tramper, J., & Wijffles, R. H. (1999) Marine bioprocess engineering: From ocean to industry. *Tibtech*, 17(August), 303-304.
- Parris, N. A. (1984). *Instrumental liquid chromatography: A practical manual on high-performance liquid chromatography methods*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Pattenden, G., González, M., Little, P., Millan, D., Plowright, A., Tornos, J., & Ye, T. (2003) Total synthesis of (+)-phorboxazole A, a potent cytostatic agent from the sponge *Phorbas* sp. *Org. Biomol. Chem.*, 1, 4173-4208.
- Piel, J. (2004) Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat. Prod. Rep.*, 21, 519-538.
- Proksch, P., Edarda, R. A., & Ebel, R. (2002) Drugs from the seas – current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, 125-134.
- Pucheault, M. (2008) Natural products\_ Chemical instruments to apprehend biological symphony. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 6, 424-432.
- Radjasa, O. K., & Sabdono, A. (2009) Bacterial symbionts of reef's invertebrates as a sustainable source of marine natural products. *Current Research in Bacteriology*, 2(1), 7-13.
- Rho, J.-R., Lee, H.-S., Sim, C., & Shin, J. (2002) Gagunis, highly oxygenated diterpenoids from the sponge *Phorbas* sp. *Tetrahedron*, 58, 9585-9591.
- Riguera, R. (1997) Isolating bioactive compounds from marine organisms. *Journal of Marine Biotechnology*, 5, 187-193.
- Salomon, C. E., Magarvey, N., & Sherman, D. (2004) Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. *Nat. Prod. Rep.*, 21, 105-121.
- Searle, P., & Molinski, T. (1995) Phorboxazoles A and B: Potent Cytostatic Macrolides from Marine Sponge *Phorbas* Sp. *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 8126-8131.

- Seco, J. M., Quiñoá, E., & Riguera, R. (2004) The Assignment of Absolute Configuration by NMR. *Chemical Reviews*, 104(1), 17-118.
- Seidl, P. (2002) Pharmaceuticals from natural products: Current trends. *Anais da Academia brasileira de Ciências*, 74(1), 145-150.
- Simmons, T., Andrianasolo, E., McPhail, K., Flatt, P., & Gerwick, W. (2005) Marine natural products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(2), 333–342.
- Sipkema, D., Franssen, M., Osinga, R., Tramper, J., & Wijffels, R. (2005). Marine sponges as a pharmacy. *Marine Biotechnology*, 7, 142-162.
- Sipkema, D., Osinga, R., Schatton, W., Schatton, W., Mendola, D., Tramper, J., & Wijffels, R. (2005). Large-Scale Production of Pharmaceuticals by Marine Sponges: Sea, Cell, or Synthesis? *Biotechnology and Bioengineering*, 90(2), April 20, 201-222.
- Skepper, C., MacMillan, J., Zhou, G., Masuno, M., & Molinski, T. (2007) Chlorocyclopropane macrolides from marine sponge *Phorbas* sp. Assignment of the configurations of phorbasides A and B by quantitative CD. *Journal of American Society*, 129, 4150-4151.
- Skoog, D.; West, D., Holler, F. (1994) *Analytical chemistry. An introduction*. Saunders College Publishing (USA).
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J. (1979) *Introduction to modern liquid chromatography*. 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley & sons, Inc.
- Sorrell, T. (1988) *Interpreting spectra of organic molecules*. University Science Books, Mill Valley, CA.
- Still, C., Kahn, M., & Mitra, A. (1978) Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem*, 43(14), 2923-2925.
- Sukarmy & Radjasa, O. (2007). Bioethical consideration in the search for Bioactive compounds from reef's invertebrates. *Journal of Applied Sciences*, 7(8), 1235-1238.
- Taylor, M., Radax, R., Steger, D., & Wagner, M. (2007). Sponge-associated microorganisms: Evolution, ecology and biotechnological potential. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 71(2), 295-347.

- Taylor, M., Schupp, P., Dahllöf, I., Kjelleberg, S., & Steinberg, P. (2004) Host specificity in marine sponge-associated bacteria and potential implications for marine microbial diversity. *Environmental Microbiology*, 6(2), 121–130.
- Troncoso, J. S., Garcia, F. J., & Urgorri, V. (1998) Anatomical data on a rare *Hypselodoris picta* (Schultz, 1836) (Gastropoda, Doridacea) from the coast of Brazil with description of a new subspecies. *Bulletin of marine science*, 63(1): 133–141.
- Vogel, G. (2008). The inner life of sponges. *Nature*, 320(23 May), 1028-1030.
- Wang, G. (2006) Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 545-551.
- Zengler, K., Toledo, G., Rappé, M., Elkins, J., Mathur, E., Short, J., & Keller, M. (2002) Cultivating the uncultured. *PNAS*, 99(24), 15681–15686).
- Zhang, H., & Capon, J. (2008) Phorbasins D-F: Diterpenyl-aurines from a Southern Australian marine sponge, *Phorbas* sp. *Organic letters*, 10(10), 1959-1962.

#### **Sites consultados:**

- [1] [www.seaslugforum.net](http://www.seaslugforum.net) (acedido em 21 de Abril 2009)
- [2] [http://www.medslugs.de/E/taxonomy/Hypselodoris\\_fontandraui.htm](http://www.medslugs.de/E/taxonomy/Hypselodoris_fontandraui.htm) (acedido em 21 de Abril 2009)
- [3] <http://www.seaslugforum.net/factsheet.cfm?base=hypsfont> (acedido em 21 de Abril 2009)
- [4] <http://www.nudipixel.net/taxonomy/> (acedido em 21 de Abril 2009)
- [5] [http://www.nudipixel.net/species/hypselodoris\\_fontandraui/](http://www.nudipixel.net/species/hypselodoris_fontandraui/) (acedido em 21 de Abril 2009)
- [6] <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=139149> (acedido em 27 de Abril 2009)
- [7] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.9141048.html> (acedido em 27 de Agosto de 2009)
- [8] <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=133677> (acedido em 27 de Abril 2009)
- [9] <http://eol.org/pages/67344> (acedido em 28 de Abril 2009)
- [10] <http://www.ebi.ac.uk/chebi/> (acedido em 17 de Junho 2009)
- [11] <http://chembank.broadinstitute.org/welcome.htm> (acedido em 17 de Junho 2009)

- [12] <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/> (acedido em 7 de Julho 2009)
- [13] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/search.cgi> (acedido em 17 de Junho 2009)
- [14] <http://www.chem.canterbury.ac.nz/marinlit/marinlit.shtml> (acedido em 7 de Julho 2009)
- [15] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.9141048.html> (acedido em 24 de Agosto de 2009)

## **6. Anexos**

---

## 6.1 Taxonomia

*Hypselodoris fontandraui*

**Reino:** Animalia

**Filo:** Mollusca

**Classe:** Gastropoda

**Subclasse:** Opisthobranchia

**Ordem:** Nudibranchia (Blainville, 1814)

**Sub-ordem:** Doridina (Odhner, 1934)

**Super-Família:** Eudoridoidea (Odhner, 1934)

**Família:** Chromodorididae (Bergh, 1891)

**Género:** *Hypselodoris* (Stimpson, 1855)

**Espécie:** *Hypselodoris fontandraui* (Pruvot-Fol, 1951)

*Phorbas sp.*

**Reino:** Animalia

**Filo:** Porifera

**Classe:** Demospongiae

**Ordem:** Poecilosclerida

**Sub-ordem:** Myxillina

**Família:** Hymedesmiidae

**Género:** *Phorbas* (Duchassaing & Michelotti, 1864)

## 6.2. Espectros e cromatogramas

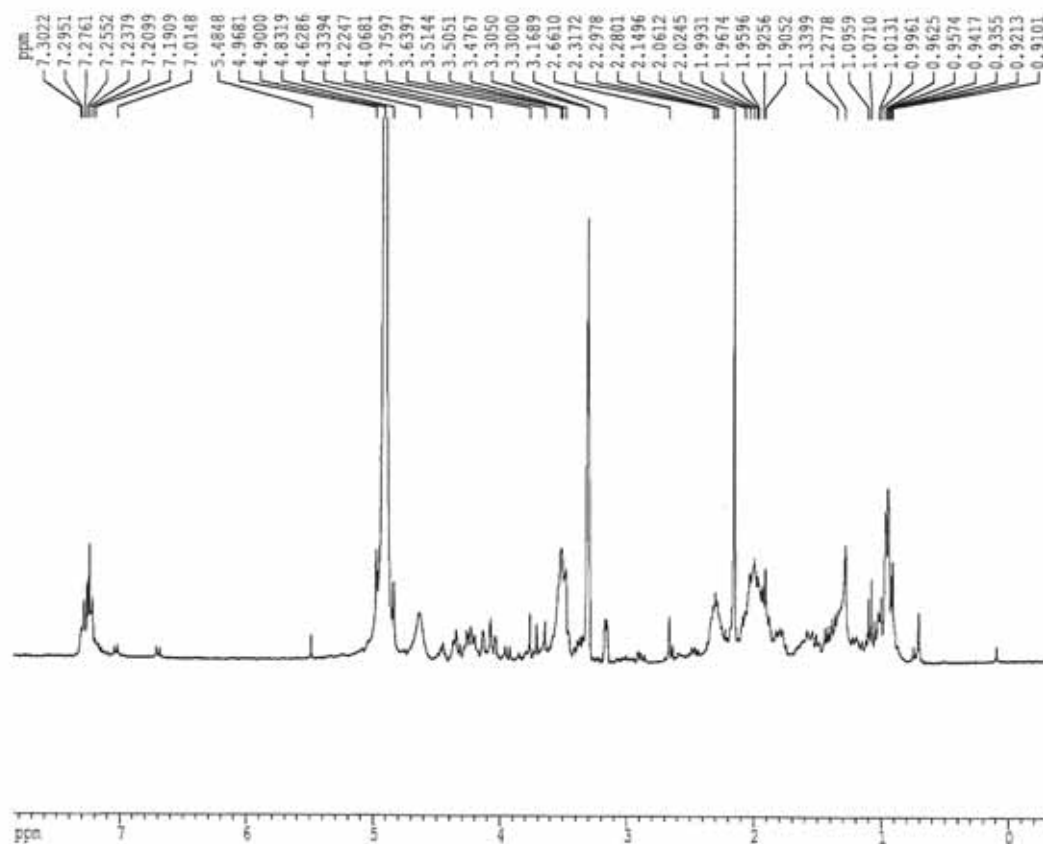


Figura 29: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração A44 proveniente da cc A

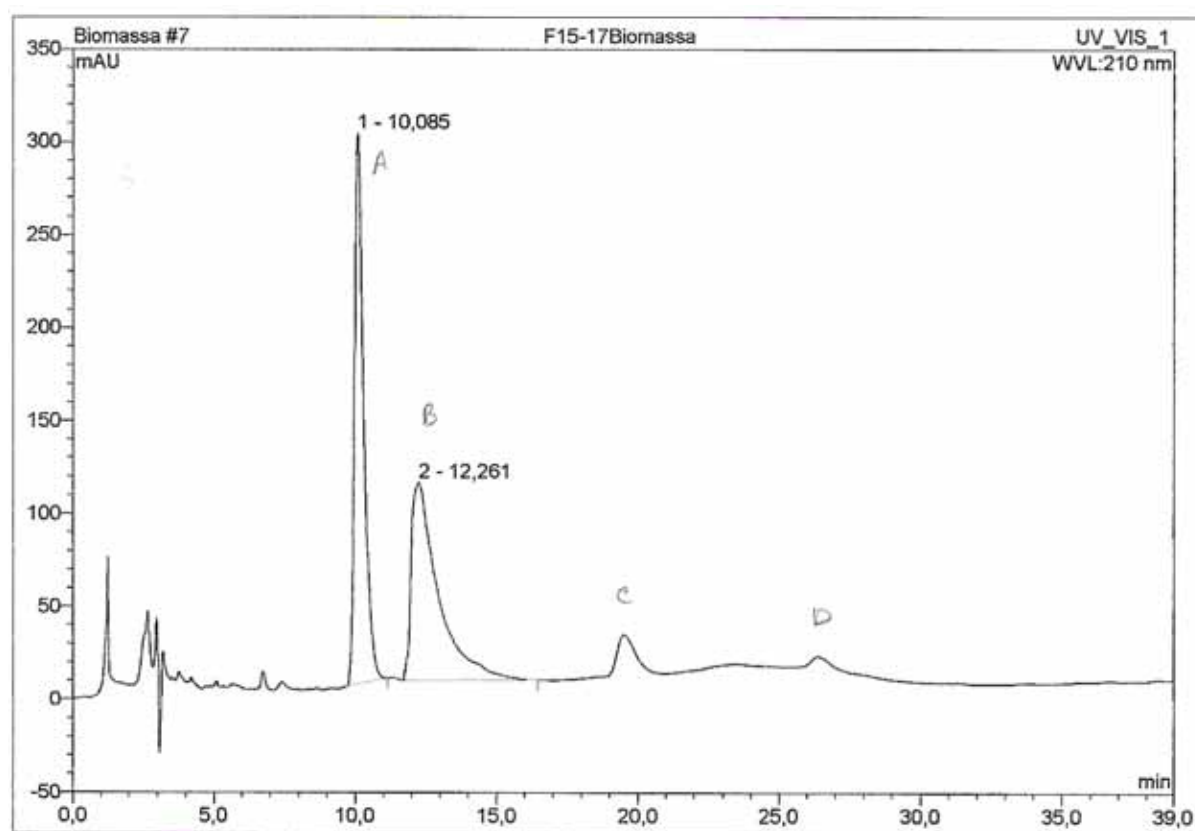


Figura 30: Cromatograma do HPLC da fracção B[15-17] proveniente da cc B



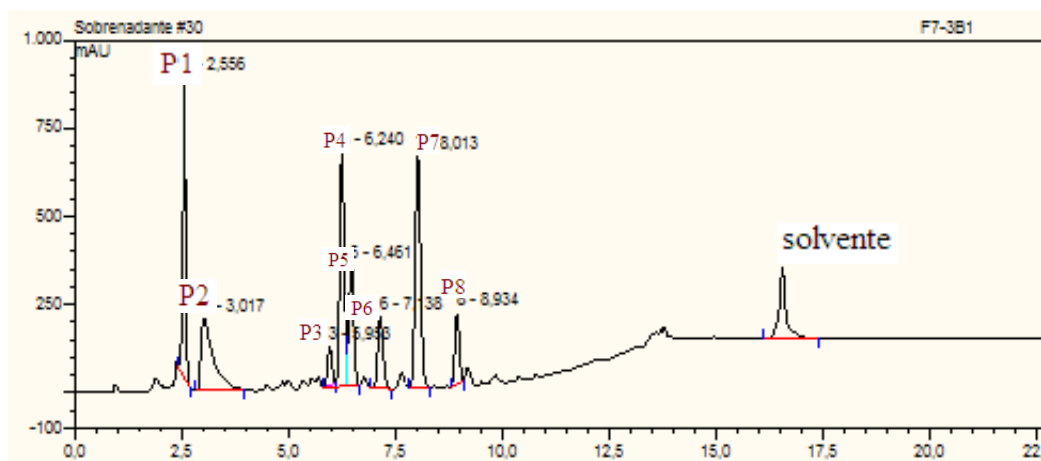


Figura 31: Cromatograma do HPLC da fracção D26 proveniente da cc D

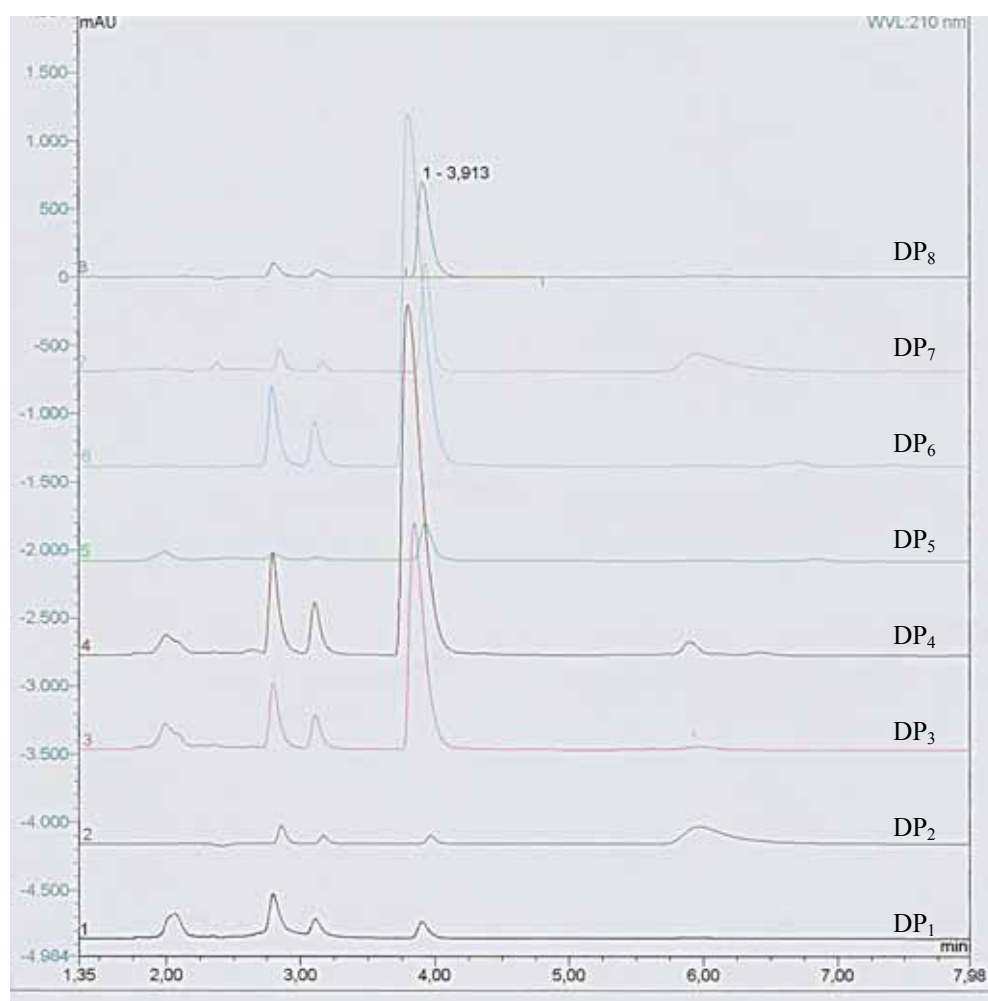


Figura 32: Cromatograma dos compostos DP<sub>1</sub> a DP<sub>8</sub>

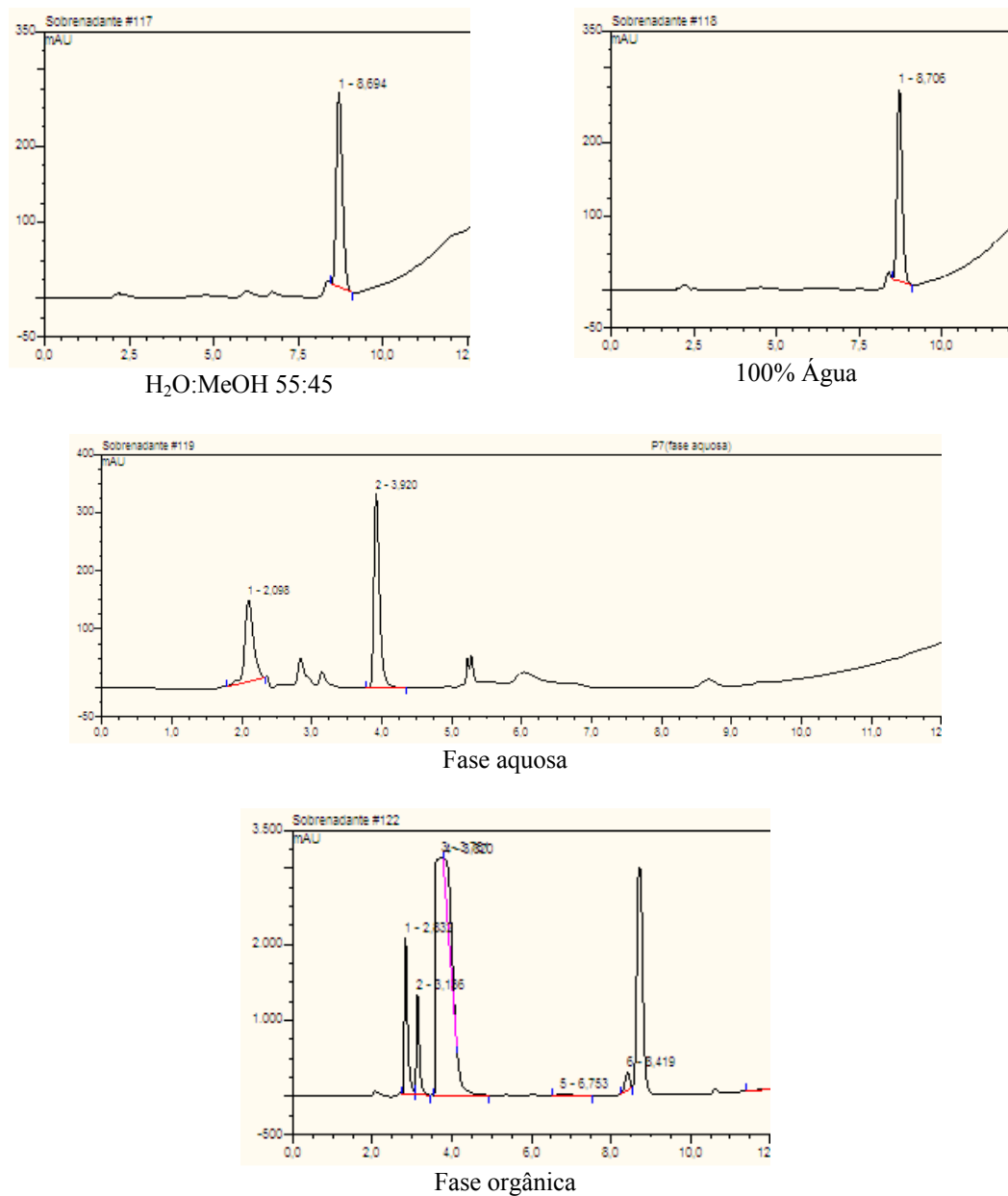


Figura 33: Cromatogramas da amostra DP<sub>7</sub> nas várias soluções após a cromatografia HPLC

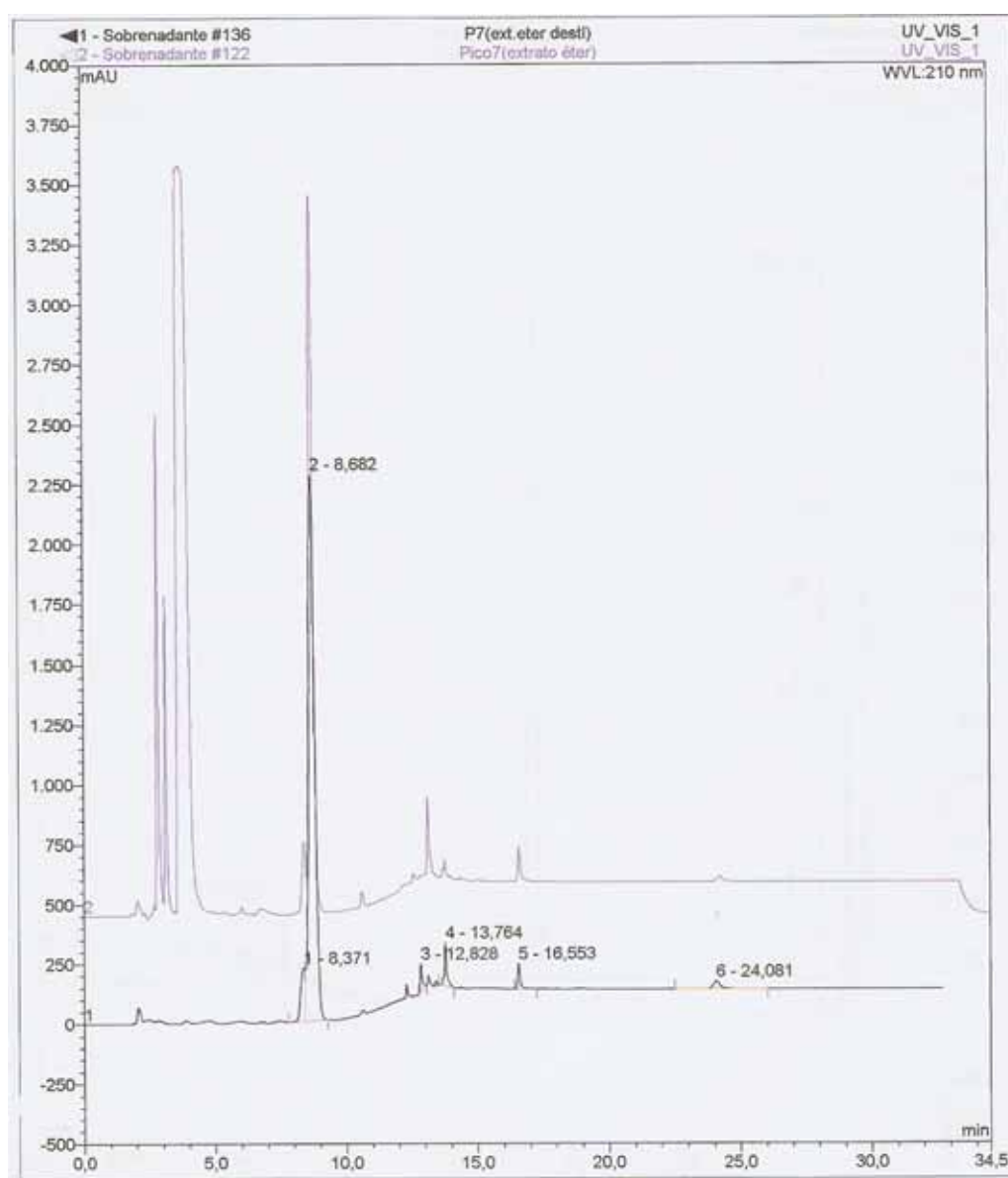


Figura 34: Cromatograma comparativo de amostras DP<sub>7</sub> em que se utilizou éter não destilado (espectro superior) e destilado (espectro inferior).

### 6.3 Composição dos reveladores

#### Revelador Sulfato de Cério (IV)

- 10g de  $\text{Ce}(\text{SO}_4)(\text{IV})$
- 100mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  15% (v/v)

#### Revelador Ácido Sulfúrico+Vanilina

- $\text{H}_2\text{SO}_4$  / Metanol 4:1
- 0,5g Vanilina /100 mL solução

#### Revelador de Ehrlich

- 1g Dimetilaminabenzaldeído
- 100 mL Ácido Clorídrico:Metanol 1:1

